

Best Available Copy

10/501238

PCT BR 03 / 00012

Rec'd PCT/PTO 12 JUL 2004



REC'D 13 MAR 2003
WIPO PCT

REPUBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Ministério do Desenvolvimento, da Indústria e Comércio Exterior.
Instituto Nacional da Propriedade Industrial
Diretoria de Patentes

CÓPIA OFICIAL

PARA EFEITO DE REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE

PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

O documento anexo é a cópia fiel de um
Pedido de Patente de Invenção
Regularmente depositado no Instituto
Nacional da Propriedade Industrial, sob
Número PI 0200269-8 de 31/01/2002.

Rio de Janeiro, 14 de fevereiro de 2003.

GLÓRIA REGINA COSTA
Chefe do NUCAD
Mat. 00449119

INPI-RJ

31 JAN 14 2026 000994

DEPÓSITO DE PATENTE
Protocolo

Número (21)

DEPÓSITO

Pedido de Patente ou de
Certificado de Adição



depósito / /

PI0200269-8

(Escreva a data de depósito)

10

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

1.1 Nome: BIOLAB SANUS FARMACÊUTICA LTDA.

1.2 Qualificação: INDÚSTRIA FARMACÊUTICA 1.3 CGC/CPF: 49.475.833/0003-60

1.4 Endereço completo: Av. dos Bandeirantes, 5386 – Planalto Paulista – São Paulo/SP –
CEP:04071-900

1.5 Telefone: (11)5586-2011

FAX:

(X) continua em folha anexa

2. Natureza:

2.1 Invenção 2.1.1. Certificado de Adição 2.2 Modelo de Utilidade

Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza desejada: .

.....INVENÇÃO.....

3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):

VIDE FOLHA ANEXA

(X) continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão do pedido nº. _____, de ____/____/____.

5. Prioridade Interna - O depositante reivindica a seguinte prioridade:

Nº de depósito _____ Data de Depósito ____/____/(66)

6. Prioridade - o depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):

País ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito

() continua em folha anexa

8 Declaraco na forma do item 3.2 do Ato Normativo n 127/97:

9. Declaração de divulgação anterior não prejudicial (Período de graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do Ato Normativo nº 127/97):

() em anexo

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)				
11.1 Guia de recolhimento	01 fls.	11.5 Relatório descritivo	47 fls.	
11.2 Procuração	03 fls.	11.6 Reivindicações	06 fls.	
11.3 Documentos de prioridade	fls.	11.7 Desenhos	06 fls.	
11.4 Doc. de contrato de Trabalho	fls.	11.8 Resumo	02 fls.	
11.9 Outros (especificar): Depositante (71), Título da Invenção (54), Inventor (72) - (Folha Anexa)			03 fls.	
11.10 Total de folhas anexas:			68 fls;	

12. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Rio, 31 de janeiro de 2002.
Local e Data

Assinatura e Carimbo
TIC - INFO CONNECTION LTDA

Agente de Propriedade Industrial - 00340

PROJ0000000000000000

FOLHA ANEXA

(2)

1. Depositante (71): **(Continuação)**
- 1.1 Nome: **FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO - FAPESP**
- 1.2 Qualificação: **FUNDAÇÃO** 1.3 CGC/CPF: **43.828.151/0001-45**
- 1.4 Endereço completo: **Rua Pio XI, 1500 – Alto da Lapa – São Paulo – SP – CEP:05468 - 901**
- 1.5 Telefone: **(11) 3838 - 4000**
FAX:

606

(3)

1. Depositante (71): **(Continuação)**
- 1.1 Nome: **ANA MARISA CHUDZINSKI-TAVASSI**
- 1.2 Qualificação: **FARMACÊUTICA/BIOQUÍMICA** 1.3 CGC/CPF: **485.879.159-91**
- 1.4 Endereço completo: **Rua Antonio Gonçalves da Cruz, 60 – Apto. 111A – São Paulo – SP – CEP:05503 - 900**
- 1.5 Telefone: **(11) 3873-0253**
FAX:

FOLHA ANEXA

3. **Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):**

"PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS DAS CERDAS DA L. OBLIQUA COM ATIVIDADE ATIVADORA DE PROTROMBINA; PROCESSO PARA DETERMINAÇÃO PARCIAL DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ATIVADOR DE PROTROMBINA; PROCESSO DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ATIVADORA DE PROTROMBINA DA FRAÇÃO II, SEQUÊNCIA N-TERMINAL E SEQUÊNCIA DE FRAGMENTOS INTERNOS DA FRAÇÃO ATIVADORA DE PROTROMBINA, ATIVADOR DE PROTROMBINA E USO DO ATIVADOR DE PROTROMBINA".

FOLHA ANEXA

(2)

7. Inventor (72): (continuação)

7.1 Nome: CLEYSON VALENÇA REIS

7.2 Qualificação: Farmacêutico/Bioquímico - Pós Doutorando da Fapesp

7.3 Endereço: Centro de Toxinologia Aplicada "CAT/CEPID" Av. Vital Brasil, 1500 -
Butantã - São Paulo - SP

7.4 CEP: 05503-900

7.5 Telefone: (011) 3763-6856

"PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS DAS CERDAS DA L. OBLIQUA COM ATIVIDADE ATIVADORA DE PROTROMBINA; PROCESSO PARA DETERMINAÇÃO PARCIAL DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ATIVADOR DE PROTROMBINA; PROCESSO DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ATIVADORA DE PROTROMBINA DA FRAÇÃO II, SEQÜÊNCIA N-TERMINAL E SEQÜÊNCIA DE FRAGMENTOS INTERNOS DA FRAÇÃO ATIVADORA DE PROTROMBINA, ATIVADOR DE PROTROMBINA E USO DO ATIVADOR DE PROTROMBINA".

10 Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a um processo de purificação de proteínas solúveis das cerdas da *L. obliqua* com atividade ativadora de protrombina ; ao processo para determinação parcial da seqüência de aminoácidos do ativador de protrombina; ao Processo de determinação da atividade ativadora de Protrombina da fração II bem como ao Ativador de protrombina e ao uso do ativador de protrombina.

20 Antecedentes da Invenção

A protrombina é uma proteína plasmática, dependente da vitamina K, que é envolvida na coagulação do sangue. A ativação da protrombina é catalisada através do complexo protrombinase que é composto pelo Fator Xa, Fator Va, fosfolipídeos e ions cálcio e ocorre através da clivagem (em seqüência) de duas ligações peptídicas da molécula

da protrombina (Mann K G. *Prothrombin and Thrombin*. In: Colman RW, Marder VJ, Salzman EW, Hirsh J eds. *Haemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice*. Philadelphia: J. B. Lippincott; 1994. P 184-99).

A primeira clivagem ocorre entre as ligações Arg.320 e He321, e esta hidrólise leva à formação de um ativador intermediário, a meizotrombina. A Segunda clivagem ocorre entre as ligações rg271 e Thr272, e libera os fragmentos 1, 2 e a serino protease α -trombina (Mann K G. *Prothrombin and Thrombin*. In: Colman RW, Marder VJ, Salzman EW, Hirsh J eds. *Haemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice*. Philadelphia: J. B. Lippincott; 1994. P 184-99).

(II)

Na ausência de fosfolipídeos, a protrombina pode ser ativada por concentrações fisiológicas do fator Xa, no entanto, a velocidade de ativação é 5 ordens de grandeza menor que a ativação pelo complexo protrombinase (Mann KG. *Membrane-bound enzyme complexes in blood coagulation*. *Prog. Hemost Thromb.* 1984;7:1-23.), sendo que o mecanismo de ativação ocorre através da formação de pretrombina (Mann KG. *Membrane-bound enzyme complexes in blood coagulation*. *Prog. Hemost Thromb.* 1984;7:1-23.) ao invés da meizotrombina (Heldebrandt CM, Butkowski RJ, Bajaj SP, Mann KG. *The activation of prothrombin*. H.

Partial reactions, physical and chemical characterization of the intermediates of activation. *J Biol. Chem.* 1973; 248: 7149-63).

A α -trombina é a serino protease responsável pela conversão do fibrinogênio em fibrina, ativação dos fatores V, VIII, e XIII, e agregação plaquetária (Mann KG, Downing MR. Thrombin generation. In: Lundblad RL, Fenton JW, Mann KG, Eds. *Chemistry and Biology of Thrombin*. Ann Arbor Science; 1977. Pp. 11-21; Lundblad RL, Kingdon HS, Mann KG. *Thrombin. Methods Enzymol.* 1976; 45:156-76). P

Muitas serpentes venenosas contêm proteínas pró-coagulantes que são capazes de ativar zimogênios, os quais participam da coagulação do sangue.

Tendo em vista que os mecanismos pelos quais as enzimas de venenos ativam os fatores da coagulação de forma diferente das enzimas encontradas em mamíferos, os ativadores de venenos podem fornecer informações adicionais sobre os mecanismos de ativação dos fatores da coagulação. Os ativadores de protrombina do veneno são classificados como Tipo 1 (p.e. ecarina), Tipo 2 (p.e. ativador de *Notechis scutatus*), 3 (p.e. *Oxyuranus scutellatus*), e 4 (p.e. ativador de *Agkistrodon acutus*) dependendo da sua interação com os componentes do complexo protrombinase (Rosing J, Tans G. *Inventory of exogenous*

prothrombin activators. Thromb. Haemost. 1991; 65 (5): 627-30).

Ativadores do tipo 1 não dependem dos componentes do complexo protrombinase, Tipo 2 dependem de fosfolipídeos , Ca ²⁺ e Fator Va, Tipo 3 dependem de fosfolipídeos e Ca ²⁺ . Ativadores do Tipo 4 podem necessitar ou não dos componentes do complexo protrombinase e podem clivar ligações peptídicas na protrombina sem convertê-la em seus produtos com atividade catalítica (e.g. trombina ou meizotrombina).

Os ativadores do Tipo 4 e a trombina hidrolisam a protrombina nas mesmas posições (Arg 155-Ser 156 e Arg 284-Thr 285), gerando fragmentos similares ou idênticos para pretrombina 1 e pretrombina 2 (Rosing J, Tans G. Structural and functional properties of snake venom prothrombin activators. *Toxicon. 1992; 30: 1515 - 27.*)

Na hemolinfa bruta da *Lonomia achelous* dois tipos de atividade de ativadores de protrombina foram descritos. Um deles é capaz de ativar diretamente a protrombina, independentemente do complexo protrombinase, e o outro é estimulado por fator v, íons cálcio, e fosfolipídeos (Guerrero BAG, Arocha-Pinango. Activation of human prothrombin by the venom of *Lonomia achelous* (Cramer) caterpillars. *Thrombos. Res. 1992;66:169-77)*.

No extrato bruto das cerdas de *L. obliqua* uma atividade procoagulante foi descrita a qual é devida a ativadores de protrombina e Fator X (Kelen EMA, Duarte A.C, Tomy SC, Sano-Martins IS, Castro SCB, Guerrero B, Arocha-Pinango CL. Acquired haemorrhagic syndrome from contact with a caterpillar (*Lonomia obliqua* Walker 1855, Saturniidae). *Toxicon* 1996; 34:146., Donato JL, Moreno RA, Hyslop S, Duarte AC, antunes E, Le Bonniec BF, Rendu F, Nucci G. *Lonomia obliqua* caterpillar spicules trigger human blood coagulation via activation of factor X and prothrombin. *Thromb. Haemost.* 1998; 79: 539-42).

O veneno de *Lonomia obliqua* causa uma severa coagulopatia de consumo, a qual pode levar à síndrome hemorrágica. O extrato bruto das cerdas apresenta uma atividade procoagulante devido à ativação do fator X e da protrombina.

Desde 1989, uma síndrome hemorrágica causada pelo contato com a taturana *Lonomia obliqua* tornou-se uma epidemia no Brasil e casos fatais devido a complicações renais e hemorragias cerebrais têm sido descritos. Os acidentes afetam o mecanismo da coagulação, resultando numa drástica diminuição do fibrinogênio, e dos fatores V e XIII. Além disso, ocorre a diminuição dos níveis de plasminogênio de α-2-antiplasmina e da atividade da proteína C, um inibidor natural da

coagulação. Estes dados indicam uma coagulopatia de consumo com fibrinólise.

Os sintomas decorrentes dos acidentes provocados pela lagarta *Lonomia obliqua* são: 5 dermatite urticante, equimoses e hematomas (espontâneos ou provocados por traumas), hemorragias das cavidades mucosas (gengivas, hemorragia nasal), hematúria, sangramento de feridas recentes, e hemorragias abdominais, 10 pulmonares, glandulares e cerebrais. Casos fatais relatados foram atribuídos a complicações renais e hemorragias cerebrais.

Estudos anteriores sobre acidentes pelo contato com *L. achelous* na Venezuela sugeriam que 15 nestes casos a síndrome hemorrágica poderia ser explicada por uma grave síndrome fibrinolítica associada a uma coagulação intravascular disseminada. Embora os sintomas clínicos de envenenamento pela *Lonomia obliqua* e *Lonomia obliqua* serem muito similares, os resultados dos 20 trabalhos executados, nos laboratórios, pelos pesquisadores da presente invenção demonstram e sugeriram uma interpretação diferente para esta última, atribuindo o principal mecanismo molecular 25 da síndrome hemorrágica à formação de trombina.

Mais especificamente, nos últimos dez anos tem sido relatado na região Sul do Brasil um crescimento de ocorrências de síndrome hemorrágica humana causada pelo contato com a lagarta *Lonomia*

obliqua. O veneno causa uma grave coagulopatia de consumo, que pode resultar numa síndrome hemorrágica.

A presente invenção parte do princípio de que um extrato bruto preparado com cerdas da *Lonomia obliqua* ativou tanto a protrombina quanto o Fator X. Em envenenamentos acidentais, ocorre a apresentação de alterações na coagulação e em fatores fibrinolíticos.

10 Lopad (*Lononia obliqua* *protrombin activator protease*) é um serino protease de cadeia simples de 69 kDa isolada do extrato das cerdas da lagarta *Lonomia obliqua*, a qual tem sua atividade aumentada por Ca²⁺, é capaz de converter diretamente protrombina em trombina de forma dose-dependente. O seu mecanismo de ação é similar ao do Fator Xa, formando fragmentos de pretrrombina na via independente do complexo protrombinase. Lopap hidrolisa um substrato fluorogênico baseado na seqüência da protrombina na mesma ligação peptídica pela trombina.

15 A presente invenção também parte da verificação da caracterização biológica da serino protease ativadora da protrombina isolada do extrato bruto das cerdas da *Lonomia obliqua*, a qual, reproduziu os efeitos do veneno total na coagulação do sangue e formação de trombos nos ratos.

De acordo com a presente invenção o Lopap purificado foi obtido de extrato bruto das cerdas de *Lonomia obliqua* onde as ditas cerdas foram extraídas em PBS, e o ativador de protrombina foi purificado por gel de filtração, e por duas etapas chromatográficas em fase reversa. A atividade ativadora de protrombina foi monitorada empregando o substrato cromogênico, S-2238 baseado na seqüência de protrombina, e clivado pela trombina.

A presente invenção vem comprovar que um único componente do veneno da *Lonomia obliqua*, Lopap, causa a síndrome hemorrágica diretamente pela ativação de protrombina e portanto deveria encaminhar uma terapia no caso de acidentes com *Lonomia obliqua*.

A avaliação dos efeitos da injeção de Lopap em ratos, analisando os parâmetros de coagulação, o comportamento dos vasos da microcirculação e os distúrbios em órgãos distintos, quando doses de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ foram injetadas, e o efeito monitorado por 1 hora, demonstrou que o sangue tornou-se incoagulável, a contagem de plaquetas decresceu aproximadamente 40% e a indução da agregação plaquetária induzida por colágeno no sangue total foi completamente abolida. Os números de eritrócitos e de leucócitos no sangue total não foram alterados, apesar da alta concentração de toxina. Por outro lado, intensa parada venular e áreas hemorrágicas foram

observadas. A geração da trombina intravascular pode explicar a diminuição da contagem das plaquetas e a hipoagregação de plaquetas após a injeção de Lopap nos ratos, sendo o trombina a principal e mais ativa agonista plaquetário.

Observando a rede microcirculatória visualizou-se coágulos de fibrina em vasos poscapilares 5 min após a injeção de Lopap. As alterações foram proeminentes 1 h após esta administração, quando parada de alguns de alguns vasos e intensas áreas hemorrágicas se tornaram aparentes. Este fenômeno pode estar implicado aos hematomas observados na maioria dos pacientes humanos envenenados. Análises histológicas de diversos órgãos em animais experimentais foram realizadas 1 hora após a injeção de Lopap. Foram encontradas alterações somente nos tecidos dos pulmões e rins, sendo este de maior importância, já que áreas hemorrágicas e necróticas foram encontradas. Pacientes que desenvolvem médio ou grave envenenamento geralmente apresentam hematúria e às vezes deficiência renal, que consequentemente podem levar à morte. As lesões nos rins encontrados nos ratos experimentais podem ser causadas pela hemorragia e/ou pelo depósito de fibrina no glomérulo. Talvez durante um tempo maior de envenenamento, os microtrombos e os sinais de congestão em outros órgãos, incluindo o

sistema nervoso central, poderiam se tornar aparentes.

Baseado nestas verificações a presente invenção sugere que Lopap é um novo ativador da protrombina, que parece ser um fator muito importante responsável pelos principais sintomas encontrados em pacientes humanos envenenados por *Lonomia obliqua*

(19)

Para avaliar se um ou mais ativadores de protrombina da toxina da taturana poderiam estar envolvidos, as proteínas solúveis das cerdas da *Lonomia obliqua* foram purificadas por cromatografias de gel-filtração e fase reversa (HPLC). A ativação da protrombina foi monitorada usando-se a protrombina e o substrato cromogênico específico para trombina 9 S2238, da Chromogenix. Os produtos da hidrólise da protrombina foram também identificados por SDS-PAGE. Uma proteína de cadeia única de 69 kDa apresentou-se como uma serino protease ativada por íons cálcio, a qual converte diretamente protrombina em trombina e pode ser incluída no grupo 1 dos ativadores de protrombina "Lonomia obliqua Phrothrombin Activator Protease" (LOPAP), foi purificada até a homogeneidade e a sua seqüência de aminoácidos não apresenta homologia com outros ativadores de protrombina nem com nenhuma outra serino protease.

Os experimentos realizados "in vivo" mostraram que injetando-se em ratos a proteína

purificada são obtidos os mesmos efeitos causados pelo extrato bruto das cerdas, ocorrendo dessa forma uma incoagulabilidade do sangue que apresenta-se de forma dose-dependente. Esta observação foi corroborada pela observação da rede microcirculatória do músculo cremaster após a injeção da proteína usando-se a técnica da microscopia intravital. Os dados obtidos demonstraram que a infusão de LOPAP produz uma coagulação intravascular e trombose em vasos pós-capilares, o qual freqüentemente contribui para o dano orgânico. Seguramente o LOPAP é o principal fator que causa o consumo da coagulopatia em acidentes com *L. obliqua*.

Um principal aspecto da presente invenção está relacionado ao Processo de purificação de proteínas solúveis das cerdas da *L. obliqua* com atividade ativadora de protrombina partindo-se da homogeneização das cerdas de *L. obliqua* em Tampão salina fosfato (PBS), num pH entre 7.4 a 8.0 seguido de centrifugação a 2500g numa temperatura de 4° a 10° C durante 30 a 60 minutos a fim de se obter um extrato bruto a base do ativador de protrombina. Segue-se, então, a purificação do ativador de protrombina a partir de 50 a 200 mg de proteína total em 2 a 10 ml de extrato bruto por cromatografia de gel filtração em resina Sephadex G-75, eluída em tampão de Tris-HCL 20 a 50 mM contendo NaCL 50 a 100 mM e

benzamidina 2 a 5 mM num pH 7.4 a 8.0 com fluxo 1,0 ml/h. Coleta-se, então, frações de 1 a 3 ml e procede-se o monitoramento do perfil protéico da cromatografia por absorbância UV em 280 nm.

5 A protrombina é ativada com o material obtido nos picos protéicos usando-se o substrato colorimétrico S-2238 específico para trombina a fim de se obter o pico PII que deve conter a ação ativadora de protrombina. Submete-se o obtido ativo à chromatografia de fase reversa através da coluna C4 no sistema analítico de HPLC empregando como solventes: A: 0,1% TFA em água (equilíbrio) e B: 10% solvente A e acetonitrila na proporção 1:9 (eluição) ou seja, solvente B: 100ml de solvente 10 A adicionados de 900 ml de acetonitrila. Utiliza-15-se gradiente de 35-50% de solvente B por 30 minutos e procede-se à detecção protéica a 214 ou 280 nm em monitor de UV. Segue-se a coleta de frações de 0.5 - 1.0 ml e liofiliza-se 15 imediatamente para eliminar a acetonitrila.

A seguir, ressuspende-se as amostras liofilizadas em tampão Tris-HCL 20 a 50 mM contendo NaCL 50 a 100 mM pH 7.4 a 8.0 e testa-25-se, então, a atividade ativadora de protrombina das frações com o material obtido nos picos protéicos usando o substrato colorimétrico S-2238 específico para trombina.

O pico ativo está nas frações eluídas entre 42 a 44% de solvente B.

Recromatografa-se a fração ativa em cromatografia de fase reversa através da coluna C4 no sistema analítico de HPLC empregando-se como solventes: A: 0,1% TFA em água (equilíbrio) e B: 5 10% solvente A e acetonitrila na proporção 1:9 (eluição) ou seja, solvente B: 100ml de solvente A adicionados de 900 ml de acetonitrila utilizando gradiente entre 20 - 80% de solvente B, durante 20 minutos. Procede-se à detecção protéica 10 a^t 214 ou 280 nm em monitor de UV. Coletam-se frações de 0.5 - 1.0 ml e liofiliza-se imediatamente para eliminar a cetonitrila. Ressuspende-se as amostras liofilizadas em tampão 15 Tris-HCL 20 a 50 mM contendo NaCL 50 a 100 mM pH 7.4 a 8.0. Testa-se a atividade ativadora de protrombina das frações com o material obtido nos picos protéicos usando o substrato colorimétrico S-2238 específico para trombina e observa-se que o pico ativo está nas frações eluídas entre 42 a 44% 20 de solvente B.

O material purificado pode se submetido a uma eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sds para avaliação da pureza. O gel pode ser corado por coomassie brilhante blue.

25 A dosagem de proteína final pode ser avaliada por dosagem de proteína por métodos colorimétricos ou por Absorbância em 280 nm.

O sistema analítico de HPLC empregado é da Merck-Hitachi (modelo D-2500) e o monitor é da Shimadzu UV (modelo SPD-6AV).

No processo da presente invenção são empregados os seguintes solventes para eluição:

- solvente A: 0,1% TFA em água e
- solvente B: 10% solvente A e acetonitrila na proporção 9:1 ou melhor, 100ml de solvente A adicionados de 900 ml de acetonitrila.

Para realizar a purificação no HPLC utiliza-se um gradiente de 35-50% de solvente B.

Uma outra modalidade da invenção está relacionada ao Processo para determinação parcial da seqüência de aminoácidos do ativador de protrömbina onde de 500 - 1000 pM do purificado é submetido à degradação por 10 pmol de tripsina em 100mM Tris-HCl, pH 8.0 contendo 0.02.% de CaCl₂ durante 18 horas a 37°C finalizando a reação com 15 % (v /v) de ácido fórmico. Neste processo, os fragmentos obtidos são separados em HPLC utilizando-se uma coluna C4, solventes de eluição a base de 0,1% de TFA em água (solvente A) e acetonitrila: solvente A (9:1) com solvente B.

Para a separação no HPLC utilizou-se um gradiente de 0-100% de solvente B com fluxo de 1.0 ml/min durante 30min.

De acordo com o processo da presente invenção determinou-se a seqüência de três

peptídeos internos e do N-terminal. A porção N-terminal contém 46 resíduos de aminoácidos e os fragmentos de peptídeos internos são:

- Fragmentos I (KSHVYTVPGFA);
- Fragmento II (KSNAHRVNIWILSRTKURAGHVEN) e
- Fragmento III (FDASKFVETDFSEKACFF).

A sequência obtida corresponde a cerca de 15% da proteína completa e massa molecular de 69KDa.

Uma outra modalidade da invenção relaciona-se ao processo de determinação da atividade ativadora de Protrombina da fração II compreendendo a pré-incubar 15 a 300nM da fração purificada durante 10 minutos a 37° C com 90 pM de protrombina na presença de 5mM de CaCl₂ para volume final de 500µL na presença de 50mM de Tris-HCl, 100mM de NaCl, pH 8 e 3 e 150 mM de imidazol, a adição de 40 µM do substrato cromogênico S-2238 (H-D-phenylalanyl-L-pipicolyl-L-arginine-p-nitroanilide dihydrochloride), à mistura de incubação e acompanhar espectrofotometricamente a 405 nm durante 10 min. a hidrólise do substrato cromogenico .

A invenção também se relaciona a Seqüência N-terminal e Seqüência de fragmentos internos da fração ativadora de protrombina caracterizada por

conter a porção N-terminal com 46 resíduos (DVVIDGACPDMKAVSKFDMNAYQGTWYEIKKFPVANEANGDCGSVE)

de aminoácidos e os fragmentos de peptídeos internos são: Fragmentos I (KSHVYTVPGFA);

5 Fragmento II (KSNAHRVNIWIL-SRTKURAGHVEN) e Fragmento III (FDASKFVETDFSEKACFF) sendo que a seqüência obtida corresponde a cerca de 15% da proteína completa e massa molecular de 69 Kda.

Uma outra modalidade da invenção está

10 relacionada ao ativador de protrombina contendo a seguinte estrutura: A proteína purificada é caracterizada como uma serino protease que hidrolisa a protrombina gerando Fragmentos 1, 2 e trombina

15 E por fim, a invenção está voltada ao uso do ativador de protrombina como um desfibrilante em estados pró trombóticos.

Em doses baixas a proteína purificada, pela sua capacidade de ativar protrombina gerando 20 trombina, retira da circulação de forma controlada o fibrinogênio, transformando-o em microcoágulos de fibrina. Esta diminuição da concentração plasmática de fibrinogênio permite que o tempo de coagulação do sangue se prolongue e, portanto, 25 impede a trombose vascular aguda.

Pelo fato de não possuir atividade proteolítica a proteína manteria a capacidade coagulante do fibrinogênio não consumido no processo. Desta forma a concentração plasmática de



fibrinogênio seria diminuída, porém não haveria predisposição para um estado hemorrágico. Além disso, poderia ser utilizada na confecção de KITS diagnósticos para detecção de protrombina plasmática.

(S)

Materiais e Métodos empregados:

Reagentes:

E-64 (trans-epoxysuccinil-L-leucilamido-(4-guanidino-butano)-protrombina,
 10 EDTA (ácido etíleno-diaminotetraacético), PMSF (fenilmetilsulfonil fluoreto), NPGB (p-Nitrofenil-p"-guanidinobenzoato) e tripsina foram obtidos da Sigma; S-2238 (H-D-fenilalanil-L-pipicolil-L-arginina-p-nitroanilida dihidrocloreto) e S-2765 (N- α -benzil-oxicarbonil-D-arginil-L-glicilLarginina-p-nitroanilida) foram obtidos da Chromogenix.

Todos os outros reagentes utilizados foram da melhor procedência possível disponível no mercado. A resina Sephadex G-75 foi adquirida da Pharmacia, a coluna C₄ (5 μm , 4., 6x250mm) da J.T. Baker, e a coluna C₁₈ ($\mu\text{Bondapack}$ 10 μm ; 22,5 mmx250mm) foi adquirida da Millipore Corp. O substrato peptídico fluorescente Abz-YQTFFNPRTEGSQ-EDDnp. (Abz= *ortho* - aminobenzoic acid; EDDnp= N-[2,4-dinitrophenyl]ethylenediamine), cuja seqüência é baseada na

seqüência da protrombina foi sintetizado no Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo, Brasil, de acordo com procedimentos descritos previamente.

5 Os exemplos ilustrativos apresentados a seguir servirão para melhor descrever a presente invenção.

Entretanto, os dados e procedimentos ilustrativos referem-se meramente a algumas modalidades de concretização da presente invenção e não devem ser tomados como limitativos do escopo da mesma.

Exemplos Ilustrativos

Exemplo 1:

15 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS DAS CERDAS DA L.
OBLIQUA COM ATIVIDADE ATIVADORA DE PROTROMBINA:

Cerdas de *L. obliqua* foram homogeneizadas em Tampão salina fosfato (PBS), pH 7.4-8.0, centrifugar a 2500g 4° a 10° C durante 30 a 60 20 minutos obtendo-se um extrato bruto a base do ativador de protrombina. O ativador de protrombina foi purificado a partir de 50 a 200 mg de proteína total em 2 a 10 ml de extrato bruto por cromatografia de gel filtração em resina Sephadex 25 G-75, eluída em tampão de Tris-HCl 20 a 50 mM contendo NaCl 50 a 100 mM e benzamidina 2 a 5 mM, pH 7.4 a 8.0 com fluxo 1,0 ml/h. Frações de 1

a 3 ml foram coletadas e monitorado o perfil protéico da cromatografia por absorbância UV em 280 nm. A protrombina foi ativada com o material obtido nos picos protéicos usando o substrato 5 colorimétrico S-2238, específico para trombina.

Foi obtido o pico PII que deve conter a ação ativadora de protrombina e Submetido à cromatografia de fase reversa através da coluna C4 no sistema analítico de HPLC empregando como 10 solventes: A: 0,1% TFA em água (equilíbrio) e B: 10% solvente A e acetonitrila na proporção 1:9 (eluição). Proceder à detecção protéica a 214 ou 280 nm em monitor de UV, coletar frações de 0.5 - 1.0 ml e liofilizar imediatamente para eliminar a 15 acetonitrila, ressuspender as amostras liofilizadas em tampão Tris-HCl 20 a 50 mM contendo NaCl 50 a 100 mM pH 7.4 a 8.0, testar atividade ativadora de protrombina das frações eluídas entre 42 a 44% de solvente B, recromatografar a fração ativa c utilizando 20 gradiente entre 20 - 80% de solvente B, durante 20 minutos.

O material purificado pode se submetido a uma eletroforese em gel de poliacrilamida contendo 25 sds para avaliação da pureza. O gel pode ser corado por coomassie brilhante blue.

A dosagem de proteína final pode ser avaliada por dosagem de proteína por métodos colorimétricos ou por Absorbância em 280 nm.

Exemplo 2:

PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS DAS CERDAS DA L.
OBLIQUA COM ATIVIDADE ATIVADORA DE PROTROMBINA.

As taturanas *L. obliqua* foram anestesiadas em atmosfera de CO₂ e suas cerdas foram removidas e mantidas no gelo. O extrato bruto foi obtido a partir de 9,9g de cerdas que foram homogeneizadas em PBS, pH 7,4 e centrifugadas a 2500 g a 4° C durante 10 minutos. O ativador de protrombina foi purificado a partir do extrato bruto (103,5 mg em 12,0 ml) através de cromatografia de gel filtração (coluna: 100x1,8 cm Sephadex G-75), que foi eluída em tampão tris-HCl 50 mM, NaCl 100mM, benzamidina 5 mM, pH 8,0, com fluxo de 15 ml/h. Foram coletadas frações de 2,0 ml e o perfil protéico da cromatografia foi monitorado por absorbância UV em 280 nm, e a ativação de protrombina foi verificada usando-se o substrato colorimétrico específico para trombina 9 pico PH, conteúdo protéico: 5,68mg) foi submetido a uma cromatografia de fase reversa empregando-se a coluna C₄ no sistema analítico de HPLC da Merck-Hitachi 9 modelo D-2500), e um monitor de UV da Shimadzu UV (modelo SPD-6AV) foram utilizados para detecção protéica a 214 nm. Os solventes para eluição foram TFA 0,1% em H₂O (solvente A), e acetonitrila: solvente a (9:1) com solvente B. A purificação no HPLC foi realizada usando-se um gradiente de 35-50% de

solvante B com fluxo de 1,0 ml/min durante 30 min. Os picos coletados foram imediatamente liofilizados. O pico protéico que apresentou atividade ativadora da protrombina foi ressuspensiondo em tampão tris-HCl 50 mM, NaCl 100mM, pH 8,0, e submetido a uma nova cromatografia usando um gradiente de 20 - 80% de solvante B, fluxo de 1,0 ml/min durante 20 min, usando-se na mesma coluna e condições descritas acima. O único pico obtido após a Segunda cromatografia no HPLC (PH-4R2) foi coletado e submetido a um SDS-PAGE. Uma aliquota do Lopap purificado foi dialisado contra EDTA 10 mM para ser utilizado nos experimentos descritos na figura 4.

A homogeneidade da proteína foi analisada por SDS-PAGE usando gel de poliacrilamida 10% (p/v) corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. As concentrações protéicas foram determinadas de acordo com método descrito previamente e por absorbância em 280 nm. A capacidade ativadora do Lopap (300 nM) foi testada na presença de diferentes concentrações de acetonitrila e após a liofilização.

Exemplo 3:

DETERMINAÇÃO PARCIAL DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS
DO ATIVADOR DE PROTROMBINA :

Submeter 500 - 1000 pM do purificado à degradação por 10 pmol de tripsina em 100mM Tris-HCl, pH 8.0 contendo 0.02.% de CaCl₂ durante 18 horas a 37°C finalizando a reação com 15 % (v/v) de ácido fórmico.

Separar os fragmentos obtidos são separados em HPLC utilizando-se uma coluna C₄, solventes de eluição a base de 0,1% de TFA em água (solvente A) e acetonitrila: solvente A (9:1) com solvente B.

Para a separação no HPLC utilizou-se um gradiente de 0-100% de solvente B com fluxo de 1.0 ml/min durante 30min.

Exemplo 4:

DETERMINAÇÃO PARCIAL DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO Lopap:

O Lopap purificado (500pM) foi submetido a degradação por tripsina (10 pmol) em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 contendo CaCl₂ 0,02% durante 18 h a 37°C. A reação foi interrompida usando-se ácido fórmico 15% (v/v). Os fragmentos obtidos foram separados em HPLC usando uma coluna C₄, e os solventes de eluição foram TFA 0,1% em H₂O (solvente A), e acetonitrila: solvente A (9:1) com solvente B.

Para a separação no HPLC foi utilizado um gradiente de 0-100% de solvente B, com fluxo de 1,0 ml/min durante 30 min. A seqüência de três

peptídeos internos e do N-terminal foi determinada usando-se o equipamento da Applied BioSystem que realiza as reações da degradação de Edman (17). A busca para verificar homologia da estrutura primária do Lopap com outras proteínas foi realizada usando-se o banco de dados Swiss Protein Data Base.

(3)

Exemplo 5:

ATIVIDADE ATIVADORA DE PROTROMBINA:

A capacidade do Lopap ativar a protrombina foi indiretamente determinada através do ensaio de formação de trombina a partir da protrombina usando o substrato cromogênico S-2238. A atividade ativadora da protrombina do extrato das cerdas, das frações parcialmente purificadas e do Lopap purificado (15 a 300nM) foi avaliada após pré-incubação durante 10 min a 37°C com protrombina (90 pM), na presença de 5 mM de CaCl₂ para volume final de 500μl. Esta reação ocorreu em Tris-HCl 50mM, NaCl 100mM, pH 8,3, contendo imidazol 150mM. A hidrólise de S-2238 40μM pela trombina formada a partir do Lopap usando 90nM do fator II e 90nM de trombina purificada foi acompanhada espectrofotometricamente a 405 nm durante 10 min a 37°C.

Exemplo 6:

ATIVIDADE ATIVADORA DO FATOR X:

Fator X (30nM) foi pré-incubado com Lopap 75nM durante 20 min a 37°C em 120 μ l de tampão Tris-HCl 25mM pH 8,3 contendo NaCl 200mM e CaCl₂ 10 mM. A seguir 150 μ l de tampão Tris-HCl 50mM pH 8,3 contendo imidazol 150 mM, NaCl 100mM e 165 μ l de tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0 contendo Hepes 10mM, NaCl 500 mM e PEG 6000 0,1% foram adicionados até o volume final de 500 μ l. A formação do fator Xa foi acompanhada através da absorbância em 405 nm durante 10 min a 37 °C após a adição de 150 μ M do substrato S-2765. A hidrólise de 150 μ M do substrato S-2765 por 30 nM do Fator Xa purificado foi acompanhado usando as condições experimentais descritas.

Exemplo 7:

ATIVIDADE DO LOPAP SOBRE O FIBRINOGÊNIO PURIFICADO

Lopap (2 μ M) foi incubado na presença e na ausência de fator II (90nM) em tampão Tris-HCl 50mM, contendo CaCl₂ 5mM e NaCl 100mM, num volume final de 300 μ l durante 10 min a 37 °C . Em seguida, fibrinogênio humano purificado (7,5 μ M 0 (Chromogenix) foi adicionado e a transformação da protrombina em trombina foi avaliada através do tempo de coagulação.

Exemplo 8:

ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA COM SUBSTRATO
FLUOROGENICO E DETERMINAÇÃO DOS SÍTIOS DE
CLIVAGEM:

(84)

O ensaio foi realizado usando-se o substrato de fluorescência apagada Abz-YQTFENPRTFGSQ-EDDnp no espectrofluorímetro da marca Hitachi F-2000 nos comprimentos de onda de 320nm (excitação) e 420 nm (emissão). Antes da adição de 10 μ l da solução estoque do substrato (preparado em DMF:H₂O, 1:1 v/v), a enzima (73,3pM) foi incubada em uma cubeta termoestável com 1,5ml de tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,0 a 37°C. A partir dos dados da velocidade que forem registradas continuamente por 10 min foram determinadas as constantes cinéticas Km e Kcat. As constantes cinéticas e seus respectivos erros foram obtidos através da equação de Michaelis-Menten usando-se o método descrito por Wilkinson . Para a determinação do sítio de clivagem, os fragmentos peptídicos foram separados através de cromatografia de fase reversa em HPLC usando-se uma coluna C₁₈. Os solventes de eluição são TFA 0,1% em H₂O (solvente A), e acetonitrila-solvente A (9:1) como solvente B. O gradiente usado para a separação foi de 10-100% do solvente B, com fluxo de 1ml/min. Os sítios de clivagem foram determinados usando fragmentos internos de peptídeos sintéticos usados como padrão.

Exemplo 9:

INIBIÇÃO DE LOPAP

O ensaio para a verificação da enzimática do Lopap foi realizada através de substratos cromogênicos, neste experimento foram utilizados os inibidores PMSF (10mM) ou E-64 (3.2mM) com Lopap (75nM) num volume final de 500 μ l. Os inibidores foram pré-incubados com Lopap durante 15 min a 37°C antes da adição do substrato S-2238 (40 μ M).

Exemplo 10:

INFLUÊNCIA DE ÍONS BIVALENTES NA ATIVIDADE DO LOPAP:

O Lopap foi exaustivamente dialisado contra EDTA 100mM durante 48 h a 4 °C Lopap (75 nM) dialisado ou não tratado foi incubado na presença na ausência de CaCl₂ (5 mM), Mg Cl₂ (5mM), ou Zn Cl₂(5 mM); a 37 °C durante 10 min com Fator II (90mM), na presença de 40 μ M do substrato S-2238, com tampão Tris-HCl 50mM, contendo NaCl 100mM, pH 8,3, num volume final de 500 μ l. A hidrólise do substrato foi monitorado espectrofotometricamente a 405 nm durante 20 min em um equipamento Beckman DU-7.

Exemplo 11:

TITULAÇÃO DA ATIVIDADE DA SERINO PROTEASE LOPAPPOR NPGB:

O ensaio cromogênico para a titulação do sítio ativo Lopap foi realizada com o reagente NPGB, seguindo protocolo descrito previamente. A concentração do Lopap ativo foi determinada através da titulação com p-nitrofenil-p'-guanidinobenzoato $0,47\mu M$ (NPGB) em tampão barbital sódico $0,1M$, pH 8,3 a $37^{\circ}C$, num volume final de 1,0 ml. O p-nitrofenol liberado foi quantificado em absorbância a $410nm$ em um espectrofotômetro Hitachi U-2000.

Exemplo 12:

DETERMINAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE PROTROMBINA POR

LOPAP:

Lopap ($30nM$) foi incubado com protrombina ($500nM$) durante 0, 1, 3, 6, 8 e 24 h a $37^{\circ}C$ em $500\mu l$ de tampão Tris-HCl 50 mM , contendo CaCl_2 (5 mM) e NaCl 100mM , pH 8,0. Os resultados da hidrólise foram analisados por SDS-PAGE (gel 10%) sob condições redutoras e não redutoras e corado pelo método de coomassie Brilliant Blue R-250.

Exemplo 13:

PURIFICAÇÃO DO ATIVADOR DE PROTROMBINA (LOPAP):

O processo de purificação do Lopap incluiu uma cromatografia de gel filtragem e duas chromatografias de fase reversa. O perfil protéico obtido na chromatografia de gel filtração está representado na figura 1 A. Somente a filtração

(3)

denominada PII apresentou a capacidade de ativar a protrombina, o qual foi submetido a cromatografia de fase reversa, que resultou em vários picos que estão representados na figura 1B. A capacidade de ativação da protrombina foi detectada no pico eluido com 43% de acetonitrila (fig. 1B). Esta fração que continha a atividade foi submetida a uma Segunda cromatografia de fase reversa resultando em dois picos, sendo que apenas um deles apresentou a capacidade de ativar a protrombina (Fig. 1C). A fração de interesse foi novamente submetida a uma cromatografia de fase reversa usando as mesmas condições, com , objetivo de confirmar a presença de um único pico 9 (Fig. 1D). Esta purificação resultou em uma proteína com cerca de 50% da atividade, como está mostrado na tabela 1. A homogeneidade da preparação da proteína está representada na Fig. 1D. O material purificado apresentou uma banda única de aproximadamente 69 KDa no SDS-PAGE.

Exemplo 14:

DETERMINAÇÃO DA SEQÜÊNCIA N-TERMINAL E DE
FRAGMENTOS INTERNOS DO LOPAP:

A porção N-terminal com 46 resíduos de aminoácidos

(DVVIDGACPDMKAVSKFDMNAYQGTWYEIKKFPVANEANGDCGSVE)
foi obtida a partir do Lopap purificado, assim

como a seqüência de alguns fragmentos de peptídeos internos denominados Fragmentos I: KSHVYTVFPGA. Fragmento II: KSNAHRVNIWILSRTKVRAGHVN e Fragmento III: FDQSKFVETDFSEKACFF. A seqüência obtida correspondeu a cerca de 15% da proteína completa assumindo-se a massa molecular de 69 kDa.

Exemplo 15:

CAPACIDADE DE ATIVAÇÃO DE PROTROMBINA:

A trombina gerada a partir do Lopap ocorreu de forma dose dependente (Fig. 2). Protrombina (90nM) foi incubada com 75 nM de Lopap gerando a mesma quantidade de trombina, que foi capaz de hidrolisar o substrato S-2238 (40mM), assim como a hidrólise induzida por 90 nM de trombina purificada. A atividade da trombina foi detectada a partir de 1 min de pré-incubação.

Exemplo 16:

ATIVIDADE ATIVADORA DE FATOR X:

O Lopap não apresentou capacidade de ativar o fator X e, além disso, não foi capaz de hidrolisar o substrato cromogenico S-2765. A hidrólise obtida com 75 nM de Lopap incubado durante 10 min a 37 °C do substrato S-2765 150 µM foi de 0,34 µM. A concentração de p-nitroanilida formada durante a reação foi calculada usando-se o

valor $8900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o coeficiente de extinção molar a 405 nm. Quando Fator X (30nM) foi adicionado ao ensaio, a hidrólise do substrato obtida foi de $2,6 \mu\text{M}$. Na ausência de 5 Lopap a absorbância do Fator Xa (30nM) purificado foi $34 \mu\text{M}$.

Exemplo 17:

COAGULAÇÃO DO FIBRINOGÊNIO POR LOPAP:

O Lopap não apresentou atividade do tipo trombina sobre o fibrinogênio purificado, assim como poderia ser deduzido a partir do prolongamento do tempo de coagulação (tabela 2). No entanto, na presença de protrombina, a formação de um coágulo sólido foi observada após 240s, e a adição de Ca^{2+} reduziu o tempo de coagulação para 15 60s.

Exemplo 18:

ATIVIDADE HIDROLÍTICA DO LOPAP SOBRE O PEPTÍDEO

FLUOROGÊNICO:

20

Os parâmetros cinéticos determinados para o Lopap usando o substrato de fluorescência apagada Abz-QTFFNPRTFGSQ-EDDnp, baseado na seqüência da protrombina foram $K_{mapp} 4,5 \mu\text{M}$; $K_{cat} 25 5,32 \text{ sec}^{-1}$; $K_{cat}/K_{mapp} 1,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, indicando uma boa afinidade e uma alta eficiência

catalítica para a enzima estudada, sendo que estes parâmetros foram obtidos de acordo com Chagas et al. A seqüência de aminoácidos originada a partir dos fragmentos internos do Lopap mostrou atividade sobre o substrato Abz-YQTFNPRTEGSQ-EDDnp o qual foi hidrolisado em dois sítios Phe-Phe (10%) e Arg-Thr (90%) (Fig. 3)

(40)

Exemplo 19:

INIBIÇÃO E INTERFERÊNCIA ÍONS BIVALENTES NA ATIVIDADE DE LOPAP:

10

A atividade do Lopap foi drasticamente diminuída após a diálise contra EDTA, e pode ser substancialmente recuperada através da adição de Ca²⁺ (Fig. 4). Além disso, a atividade do Lopap foi completamente abolida por PMSF 10 mM, enquanto não afetada por E-64 3,2 mM. A titulação dos resíduos putativos de serina encontrados no Lopap usando-se o NPGB indicou a estequiometria de 1,2 resíduos de serina por molécula de NPGB.

Como pode ser visualizado na Fig. 4, Lopap diretamente ativado por protrombina mostrou um aumento da atividade após a adição de íons Ca²⁺. Após ter sido submetido a exaustiva diálise contra EDTA, a atividade do Lopap diminuiu cerca de 75%, e pode ser gradativamente recuperada através da adição de concentrações crescentes de íons Ca²⁺.

Outros íons bivalentes, tais como Mg^{2+} e Zn^{2+} não produziram o mesmo efeito.

Exemplo 20:
DETERMINAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE PROTROMBINA POR LOPAP:

Sobre condições não redutoras a hidrólise da protrombina (72 kDa) por Lopap resultou em vários fragmentos (massas moleculares de 52 kDa, 36 kDa, 27 kDa e 16 kDa representando o peptídeo F1/F2, pretrombina 2 ou α -trombina, Fragmento-1 (F1) e Fragmento-2 (F2) respectivamente. Sobre condições redutoras, a ativação de protrombina resultou em fragmentos de massas moleculares 52 kDa, 36 kDa, 32 kDa, 27 kDa e 16 kDa, representando F1/F2-activation peptide, pretrombina 2, trombina B-chain, Fragmento-1 (F1) e Fragmento-2 (F2), respectivamente (fig.5)

Exemplo 21:

20 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ATIVADORA DE PROTROMBINA DA FRAÇÃO II:

Pré-incubar 15 a 300nM da fração purificada durante 10 minutos a 37° C com 90 pM de protrombina na presença de 5mM de $CaCl_2$ para volume final de 500 μ L na presença de 50mM de Tris-HCl, 100mM de NaCl, pH 8 e 3 e 150 mM de imidazol, a adição de 40 μ M do substrato cromogênico S-2238 (H-D-phenylalanyl-L-pipicolyl-L-arginine-p-

nitroanilide dihydrochloride), à mistura de incubação e acompanhar espectrofotometricamente a 405 nm durante 10 min. a hidrólise do substrato cromogenico .

5 Exemplo 22:

TESTE DA ATIVIDADE DO LAPAP NO PLASMA HUMANO

NORMAL:

A fim de testar a atividade procoagulante do Lopap, extrato bruto de cerdas (10 a 30 µg) ou 10 a enzima purificada (1 a 16 µg) foram incubadas a 37 °C com 100µg de plasma humano normal na presença de 6,25 mM de CaCl₂; num volume final de 400µg. A atividade pró-coagulante foi avaliada pela redução do tempo de recalcificação do plasma comparado ao tempo de coagulação do plasma na ausência de Lopad 15 ou extrato bruto (controle).

Exemplo 23:

OS EFEITOS DE LOPAP NA REDE MICROCIRCULATÓRIA

Estudos microscópicos intravitais:

20 Os efeitos de Lopap na rede microcirculatória foram determinados *in situ* na fasquia espermática interna em ratos anestesiados (250g) (pentobarbital sódico, 50 mg/kg. Intraperitoneal 0. A técnica cirúrgica empregada 25 para este procedimento foi descrita .

Resumidamente, os anormais foram mantidos numa mesa especial termostaticamente controlada a 37°C incluindo uma plataforma transparente na qual o tecido foi colocado para ser transiluminado. A preparação foi mantida úmida e quente pela irrigação do tecido com solução aquecida de Ringer-Locke, 154mM de NaCl, 5,6mM de KCl, 2mM de CaCl₂, 6 mM de NaHCO₃, e 6 mM de glicose, pH 7,2 - 7,4, contendo 1% de gelatina. Através de uma câmera de vídeo colorida incorporada a um microscópio triocular (Axioskope, Carl Zeiss), as imagens da microcirculação foram simultaneamente visualizadas nos monitores da TV e do computador. As imagens obtidas no monitor da TV foram gravadas em vídeo e as imagens digitalizadas no computador foram analisadas usando software (KS300, Kontron). As imagens foram obtidas usando uma distância longitudinal de abertura no diafragma/numérica objetiva de x10/025x1.6 optovar. Lopap (100µg/kg) foi injetado i.v. (veia caudal) e a dinâmica da microcirculação dos vasos foram observadas nos monitores. Anomais controle receberam volumes equivalentes de salina estéril. Uma hora após a injeção e a observação da microcirculação, o sangue foi coletado da aorta abdominal (500µg), e o tempo de coagulação do sangue total foi medido.

Exemplo 24:

Estudo in vivo:

AH

Lopap (100 μ g/kg), foi injetado através da veia caudal em ratos machos do tipo Wistar pesando 200-250g. Ratos controle receberam 150mM de NaCl sob as mesmas condições. Após uma hora, eles foram anestesiados e o sangue foi coletado pela aorta abdominal em seringas plásticas. Sangue para contagem de células foi anticoagulado com 2,7mM de Na₂-EDTA, e para agregação plaquetária do sangue total com 139mM de citrato trisódico (1 parte para 9 partes de sangue total) foi adicionado. Plasma pobre em plaquetas foi obtido pela centrifugação do sangue com citrato a 1900g por 15 min. a 4° C. A agregação plaquetária do sangue total foi realizada como descrito em Sano-Martins IS, Santoro ML, Castro SCB, Fan HW, Cardoso JLC, theakson RDG. *Platelet aggregation in patients bitten by the brazilian snake Bothrops jararaca . Thromb. Res.* 1997; 87 (2): 183-95. Colágeno (5 μ g /ml. De concentração final) (Hormon-Chemie, Alemanha) foi usado como um agonista para induzir a agregação das plaquetas. As contagens das células do sangue foram realizadas num sistema Serono-Baker 9020+AX, e o fibrinogênio foi mantido de acordo com von Clauss (*gerinnungsphysiologische schnellmethode zur bestimmung des fibrinogens. Acta Haematol* 1957, 17: 237-46) com reagentes e controles da Diagnóstica Stago.

Exemplo 25:

HISTOPATOLOGIA:

Os mesmos animais empregados nos estudos in vivo foram usados para análises histopatológicas. Fragmentos de cérebro, pulmões, fígado e rins foram coletados e colocados por 48 horas numa solução a 10% de formalina. Eles foram, então embebidos em parafina, e processados para análises histológicas de rotina e analisadas após a coloração com eosina.

10 Exemplo 26:

ANÁLISES ESTATÍSTICAS:

Com a finalidade de comparar a contagem de plaquetas e agregação plaquetária do sangue total entre ratos injetados com Lopap e ratos controle, estudo do teste-t foi empregado, usando o software de estatística Stata™ 5.0.

Resultados:

a) Atividade do Lopap sobre o plasma:

O extrato bruto da cerda foi incubado com plasma humano normal citratado e o tempo de coagulação obtido foi entre 290-80 s (tabela 1), enquanto Lopap (1-16 μ g) coagulou o plasma humano normal citratado num intervalo de tempo similar (tabela 1)

25 b) Testes biológicos com Lopap:

1. Estudos

microscópicos

intravirais:

A administração intravenosa de proteína provocou proeminentes alterações na rede microcirculatória do músculo cremaster. A formação de trombos foi observada em pequenos vasos (10 - 30 μ m de diâmetro), principalmente em vênulas 5 min após a injeção. Este efeito foi mais pronunciado após 40 min, quando o envenenamento sistêmico com total parada venular e trombos nas arteríolas foram claramente visualizadas (fig. 6). Áreas hemorrágicas foram visualizadas após 30 min. da administração de Lopap. Uma hora após a injeção, o sangue obtido dos animais tratados com Lopap estava incoagulável. Animais controle que receberam solução salina não apresentaram alterações microcirculatórias.

2. Parâmetros coagulantes "in vivo":

A contagem de plaquetas decresceu uniformemente nos ratos injetados com Lopap, cerca de 40% em comparação aos ratos controle, bem como a agregação plaquetária induzida por colágeno foi abolida. Nenhuma alteração morfológica ou quantitativa tanto de eritrócitos ou de células da linhagem de leucócitos foram observadas. Nenhum fibrinogênio foi detectado nestes animais.

3. Histopatologia:

Uma hora após a inoculação de Lopap, uma pronunciada infiltração de leucócitos foi

(b6)

observada nos pulmões dos animais experimentais (Fig. 7B e C). Neutrófilos e monócitos aderiram as células endoteliais de pequenos vasos sanguíneos. Estas células também foram detectadas nos espaços parenquemais do órgão (fig. 7C). Uma marcante congestão vascular foi observada nos vasos glomerulares e em vasos entre os túbulos renais proximais e distais (fig. 8b) A hemorragia não foi observada somente nos vasos glomerulares, mas também em outros vasos do órgão. Na região medular, células tubulares apresentaram áreas focais de necrose hialina. Alterações histológicas não foram observadas quando outros órgãos foram analisados.

Acidentes devido ao contato com as cerdas da taturana *Lonomia obliqua* causam a incoagulabilidade do sangue em seres humanos e alterações nos fatores de coagulação que estão relacionados com a trombina e podendo levar a síndrome hemorrágica. Proteínas procoagulantes tais como fator X e ativadores de protrombina de venenos de animais são responsáveis pela coagulopatia de consumo através da depleção de fibrinogênio. Embora a via de ativação de protrombina mais importante ser através do complexo protrombinase, a protrombina também pode ser ativada por fatores exógenos, tais como componentes do veneno de serpentes através de vias distintas.

Após comparar os produtos de hidrólise da protrombina gerada a partir do Lopap (tabela 3) com os fragmentos gerados por outros ativadores de protrombina, um mecanismo de ação pode ser sugerido envolvendo a formação de pretrombina 2 e trombina.

Como aparentemente a meizotrombina não é formada por lopap e produtos com massa moleculares similares a prethrombina 2 são gerados, Lopap pode ser classificado como um ativador do Tipo 4. No entanto, os ativadores do Tipo 4 não são capazes de converter protrombina em produtos enzimaticamente ativos enquanto Lopap é capaz de gerar trombina ativa. Por outro lado, as massas moleculares dos fragmentos formados são similares àqueles formados por fator Xa na presença do complexo protrombinase. Além disso, os resultados obtidos a partir da hidrólise do substrato de fluorescência apagada, demonstram que a clivagem na cadeia principal ocorre na mesma ligação clivada pela trombina (Arg-Thr).

A auto-catálise é um dos maiores problemas detectados no ensaio de hidrólise envolvendo a protrombina, e o verdadeiro mecanismo de ação do Lopap sobre a protrombina somente será elucidado e confirmado quando um recombinante de protrombina poderá ser empregado, e a análise da espectrometria da massa e a seqüência de aminoácidos dos fragmentos forem realizadas.

(AS)

(AP)

A partir do extrato das cerdas da *L. obliqua* os inventores da presente invenção purificaram uma serino protease ativadora de protrombina de 69 kDa. Os resultados preliminares mostraram que a capacidade ativadora do Lopap é independente do complexo protrombinase, no entanto ions Ca²⁺ promoveram um aumento desta atividade. O processo de purificação do Lopap incluiu o uso de solventes orgânicos, os quais causaram uma visível perda da atividade, atingindo cerca de 50% na presença de 30% de acetonitrila e 80% na presença de 50% acetonitrila (tabela 1), dessa forma é muito difícil calcular a atividade específica da proteína. Métodos menos drásticos de purificação não foram tão eficientes, e no momento a produção de Lopap recombinante está sendo realizada.

Lopap foi caracterizado como sendo uma serino protease ativada por ions Ca²⁺, e é estruturalmente distinta de outros ativadores de protrombina descritos até o presente momento. O fragmento N-terminal apresentaram 45,6% de identidade com a porção N-terminal da inseticianina purificada da hemolinfa de *Manduca Sexta*, enquanto os fragmentos I, II, e III apresentaram respectivamente 36,4%, 37,5% e 55,5% de identidade com a seqüência dos fragmentos internos da mesma proteína (G₈₆ - Q₉₇; D₁₂₄ - E₁₄₈; I₁₆₀-Y₁₇₇).

(50)

A homogeneidade do Lopap purificado foi confirmada através de um único resíduo N-terminal. O substrato de fluorescência apagada foi desenhado de forma a conter a ligação Arg ₂₈₄-Thr ₂₈₅ da trombina, flanqueada pela sequencia Tyr ₂₇₇-Ser ₂₈₈. Este substrato foi clivado pelo Lopap na ligação peptídica correspondente à ligação da protrombina clivada tanto pelo Lopap como pela trombina.

De acordo com a presente invenção foi demonstrado que o Lopap não é capaz de ativar o fator X, tendo o ativador de Fator X purificado (resultados preliminares) do extrato bruto das gerdas de *L. obliqua*, de forma distinta do Lopap. Há ao menos dois componentes procoagulantes no veneno deste animal (tabela 3).

De acordo com a presente invenção o Lopap é um novo ativador de protrombina, o que é um importante fator responsável pela coagulopatia de consumo, encontrado em pacientes envenenados por *L. obliqua*.

Em doses baixas a proteína purificada, pela sua capacidade de ativar protrombina gerando trombina, retira da circulação de forma controlada o fibrinogênio, transformando-o em microcoágulos de fibrina. Esta diminuição da concentração plasmática de fibrinogênio permite que o tempo de coagulação do sangue se prolongue e, portanto, impede a trombose vascular aguda.

Pelo fato de não possuir atividade proteolítica a proteína manteria a capacidade coagulante do fibrinogênio não consumido no processo. Desta forma a concentração plasmática de fibrinogênio seria diminuída, porém, não haveria predisposição para um estado hemorrágico. Além disso, poderia ser utilizada na confecção de KITS diagnósticos para detecção de protrombina plasmática.

(5)

10 Tabela 1:

Influência da acetonitrila na atividade do Lopap (300nM) testada na presença de diferentes concentrações de acetonitrila. Sua atividade foi determinada indiretamente através do ensaio da formação de trombina a partir da protrombina utilizando o substrato cromogênico S-2238.

Acetonitrila (%)	Lopap	F II	S-2238	Hidrólise (%)
0	+	-	+	0
0	-	+	+	0
0	+	+	+	100
30	+	+	+	50,7
50	+	+	+	21,7
90	+	+	+	1,8

Tabela 2:

Coagulação do fibrinogênio por Lopap.

Lopap ($2\mu\text{M}$) foi incubada durante 10 min. a 37°C na presença e na ausência de Fator II (90nM), em tampão Tris-HCl 50mM contendo CaCl_2 5nM e NaCl 100mM em um volume final de 300 μl . Fibrinogênio humano purificado ($7,5 \mu\text{M}$) foi adicionado e a transformação de protrombina em trombina foi avaliada através do tempo de coagulação da fibrina

(c)

FG= fibrinogênio.

Lopap	FXa	F II	Ca 2+	FG	Tempo de coagulação (s)
-	+	+	+	+	120
-	-	+	-	+	> 1200
-	-	+	+	+	> 1200
+	-	-	-	+	> 1200
+	-	+	+	+	60
+	-	+	-	+	240

Tabela 3:

Comparação dos fragmentos de protrobina obtidos, após a hidrólise com diferentes ativadores, analisada por SDS-PAGE. A: condições redutoras; B: condições não redutoras.

5

Fragmento	Massa Molecular (kD)	Ecarina		Ativador de <i>O. scutellatus</i>		Lopap	
		A	B	A	B	A	B
Protrombina	72	+	+	+	+	+	+
Meizotrombina	72	-	+	-	+	-	-
F1/F2/ A cadeia	55	+	+	+	-	-	-
F1/F2 cadeia	52	+	+	-	+	+	+
α -trombina	36	-	+	+	+	-	+
Pretrombina 2	36	-	-	+	+	+	+
Frag. B da trombina	32	+	-	+	-	+	-
Fragmento 1	27	+	+	+	+	+	+
Fragmento 2	16	+	+	+	+	+	+

Figura 1:

PURIFICAÇÃO DO ATIVADOR DE PROTROMBINA LOPAP
ENCONTRADO NO EXTRATO DAS CERDAS DA TATURANA
LONOMIA OBLIQUA .

- 5 A) Cromatografia de gel filtração em Sephadex G-75.
 A capacidade de ativação da protrombina foi
 detectada usando-se substrato cromogênico S-
 2238.
- 10 B) Cromatografia de fase reversa (sistema de HPLC,
 coluna C4) da fração PH da etapa da gel
 filtração, eluído com um gradiente linear de 35-
 50% do solvente B.
- 15 C) Segunda chromatografia de fase reversa, como
 descrita previamente, exceto que neste caso o
 gradiente utilizado foi de 20-80% do solvente B.
- 20 D) Cromatografia de fase reversa do pico PII-4R2
 como descrita previamente. Detalhe: SDS-PAGE de
 20 μ g da proteína purificada (Poço 1), e padrão
 de massa molecular (Poço 2): fosforipase B,
 94kDa; albumina, 67kDa, ovalbumina, 43kDa;
 anidrase carbônica, 30kDa; inibidor de tripsina,
 21 kDa; α -lactoalbumina, 14.4kDa.

Figura 2:

- 25 Lopap (15-300nM) foi pré-incubada
 durante 10 min a 37°C com protrombina 90nM e
 incubada a 37°C com o substrato cromogênico S-2238
 (40 μ M) na presença de CaCl₂ 5mM no volume final

de 500 μ l. ○ 15nM; ▲ 30nM; Δ 75nM; ■ 150nM; □ 300nM.

Figura 3:

HIDRÓLISE DO SUBSTRATO FLUOROGÊNICO POR LOPAP:

(S)

- 5 A) Abz-YQTFFNPRTEGSQ-EDDnp foi incubado com Lopap em tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,0 a 37°C por 3 h. A incubação foi analisada através de cromatografia em HCl como descrito em Materiais e Método.
- 10 B) O perfil para a determinação da constante de Michaelis-Menten obtida com o substrato fluorescente substrato (0,8 - 8,0 μ M) hidrolisado por Lopap (73,3 pM).

Figura 4:

INFLUENCIA DE ÍONS BIVALENTES NA CAPACIDADE DE LOPAP ATIVAR A PROTROMBINA.

- 15 Lopap dialisado ou não tratado (75nM) foi incubado a 37°C com 40 μ M de substrato cromogênico S-2238 e protrombina 90nM; ● Controle: ausencia de protrombina; □ reação com Lopap não tratado na presença de CaCl₂ 5mM; ■ reação com Lopap não tratado na ausência de Ca²⁺; ▲ Lopap dialisado contra EDTA 100mM; Δ reação usando Lopap dialisado na presença de CaCl₂ 5 Mm; * reação usando Lopap

dialisado na presença de $MgCl_2$ 5mM mM; O reação
usando Lopap dialisado na presença de $ZnCl_2$ 5mM.

Figura 5:

5 HIDRÓLISE DE PROTROMBINA POR LOPAP SDS-PAGE:

Hidrólise de protrombina por lopap SDS-PAGE (gel
de poliacrilamida 10%) incubações de protrombina
humana (500nM) com Lopap (30nM) durante 0,1.3.6.8
e 24 h em condições redutoras. Controles: FII
10 (protrombina humana) e Fator Iia (trombina humana,
12 U).

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS DAS CERDAS DA L. OBLIQUA COM ATIVIDADE ATIVADORA DE PROTROMBINA caracterizado pelo fato de conter as seguintes etapas:

 - a) Homogeneizar cerdas de L. obliqua em Tampão salina fosfato (PBS), pH 7.4-8.0, centrifugar a 2500g 4° a 10° C durante 30 a 60 minutos obtendo-se um extrato bruto a base do ativador de protrombina ;
 - b) Purificar o ativador de protrombina a partir de 50 a 200 mg de proteína total em 2 a 10 ml de extrato bruto por cromatografia de gel filtração em resina Sephadex G-75, eluída em tampão de Tris-HCL 20 a 50 mM contendo NaCL 50 a 100 mM e benzamidina 2 a 5, mM, pH 7.4 a 8.0 com fluxo 1,0 ml/h;
 - c) Coletar frações de 1 a 3 ml e monitorar o perfil protéico da cromatografia por absorbância UV em 280 nm;
 - d) Ativar a protrombina com o material obtido nos picos protéicos usando o substrato colorimétrico S-2238 específico para trombina;
 - e) Obter o pico PII que deve conter a ação ativadora de protrombina;
 - f) Submeter o obtido ativo à cromatografia de fase reversa através da coluna C4 no sistema analítico de HPLC empregando como solventes: - A: 0,1% TFA em água (equilíbrio) e B: 10% solvente A e acetinitrila na proporção 1:9

(eluição) e proceder à detecção protéica a 214 ou 280 nm em monitor de UV;

5 g) Coletar frações de 0.5 - 1.0 ml e liofilizar imediatamente para eliminar a acetonitrila;

h) Ressuspender as amostras liofilizadas em tampão Tris-HCL 20 a 50 mM contendo NaCL 50 a 100 mM pH 7.4 a 8.0;

i) Testar atividade ativadora de protrombina das frações conforme descrito no item d);

10 j) O pico ativo está nas frações eluídas entre 42 a 44% de solvente B;

k) Recromatografar a fração ativa conforme descrito no item (e) utilizando gradiente entre 20 - 80% de solvente B, durante 20 minutos;

l) Repetir etapas de (f) a (j);

m) Submeter material purificado a uma eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS para avaliação da pureza. O gel pode ser corado por Coomassie brilhante blue;

20 n) Avaliar a concentração de proteína final por dosagem de proteína por métodos colorimétricos ou por Absorbância em 280 nm visando obter o ativador de protrombina;

25 2. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de se empregar na etapa (b) os seguintes solventes para eluição: solvente A: 0,1% TFA em água e solvente B: 10% solvente A e acetoinitrila na proporção 30 9:1;

3. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato do sistema analítico de HPLC empregado na etapa (f) ser da Merck-Hitachi (modelo D-2500 0 e o monitor da etapa (g) ser da Shimadzu UV (modelo SPD-6AV);
4. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de se realizar a purificação no HPLC da etapa (f) utilizando-se um gradiente de 35-50% de solvente B;
5. PROCESSO PARA DETERMINAÇÃO PARCIAL DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ATIVADOR DE PROTROMBINA caracterizado pelo fato de que 500 - 1000 pM do purificado é submetido à degradação por 10 pmol de tripsina em 100mM Tris-HCl, pH 8.0 contendo 0.02.% de CaCl₂ durante 18 horas a 37°C finalizando a reação com 15 % (v/v) de ácido fórmico;
6. PROCESSO de acordo com a reivindicação 5 caracterizado pelo fato de que os fragmentos obtidos serem separados em HPLC utilizando-se uma coluna C4, solventes de eluição a base de 0,1% de TFA em água (solvente A) e acetonitrila: solvente A (9:1) com solvente B;
7. PROCESSO de acordo com a reivindicação 6 caracterizado pelo fato de que para a separação no HPLC é utilizado um gradiente de

0-100% de solvente B com fluxo de 1.0 ml/min durante 30min;

8. PROCESSO de acordo com a reivindicação 7 caracterizado pelo fato de se determinar a seqüência de três peptídeos internos e do N-terminal;

9. PROCESSO de acordo com a reivindicação 8 caracterizado pelo fato de que a porção N-terminal contém 46 resíduos (DVVIDGACPDMKAVSKFDMNAYQGTWYEIKKFPVANEANGDCGSV E) de aminoácidos e os fragmentos de peptídeos internos são: Fragmentos I (KSHVYTVPGFA); Fragmento II (KSNAHRVNIWILSRTKURAGHVEN) e Fragmento III (FDASKFVETDFSEKACFF);

15 10. PROCESSO de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a seqüência obtida corresponde a cerca de 15% da proteína completa e massa molecular de 69KDa;

20 11. PROCESSO DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ATIVADORA DE PROTROMBINA DA FRAÇÃOII caracterizada pelo fato de conter as seguintes etapas:

a) Pré-incubar 15 a 300nM da fração purificada durante 10 minutos a 37° C com 90 pM de protrombina na presença de 5mM de CaCl₂ para volume final de 500µL na presença de 50mM de Tris-HCl, 100mM de NaCl, pH 8 e 3 e 150 mM de imidazol;

- b) Adicionar 40 μ M do substrato cromogênico S-2238 (H-D-phenylalanyl-L-pipicolyl-L-arginine-p-nitroanilide dihydrochloride), à mistura de incubação e acompanhar espectrofotometricamente a 405 nm durante 10 min. a hidrólise do substrato cromogênico; (6)
- 5
12. SEQUÊNCIA N-TERMINAL E SEQUÊNCIA DE FRAGMENTOS INTERNOS DA FRAÇÃO ATIVADORA DE PROTROMBINA caracterizada por conter a porção N-terminal com 46 resíduos (DVVIDGACPDMKAVSKFDMNA-YQGTWYEIKKFPVANEANGDCGSVE) de aminoácidos e os fragmentos de peptídeos internos são: - Fragmentos I (KSHVYTVPFGA); Fragmento II (KSNAHRVNIWILSRKURAGHVEN) e Fragmento III (FDASKFVETDFSEKACFF) sendo que a seqüência obtida corresponde a cerca de 15% da proteína completa e massa molecular de 69 KDa;
- 10
- 15
13. ATIVADOR DE PROTROMBINA obtido de acordo com o processo das reivindicações de 1 a 11, caracterizado pelo fato de conter a seguinte estrutura: A proteína purificada é caracterizada como uma serino-protease que hidrolisa a protrombina gerando Fragmentos 1, 2 e trombina de acordo com as figuras;
- 20
- 25 14. USO DO ATIVADOR da reivindicação 13, caracterizado pelo fato de poder ser utilizado como um desfibrilante em estados pró trombóticos;

15. USO DO ATIVADOR da reivindicação 13,
caracterizado pelo fato de poder ser utilizado
para a fabricação de kit para diagnóstico de
protrombina em plasma de pacientes com
problemas hemorrágicos;

5

(6)

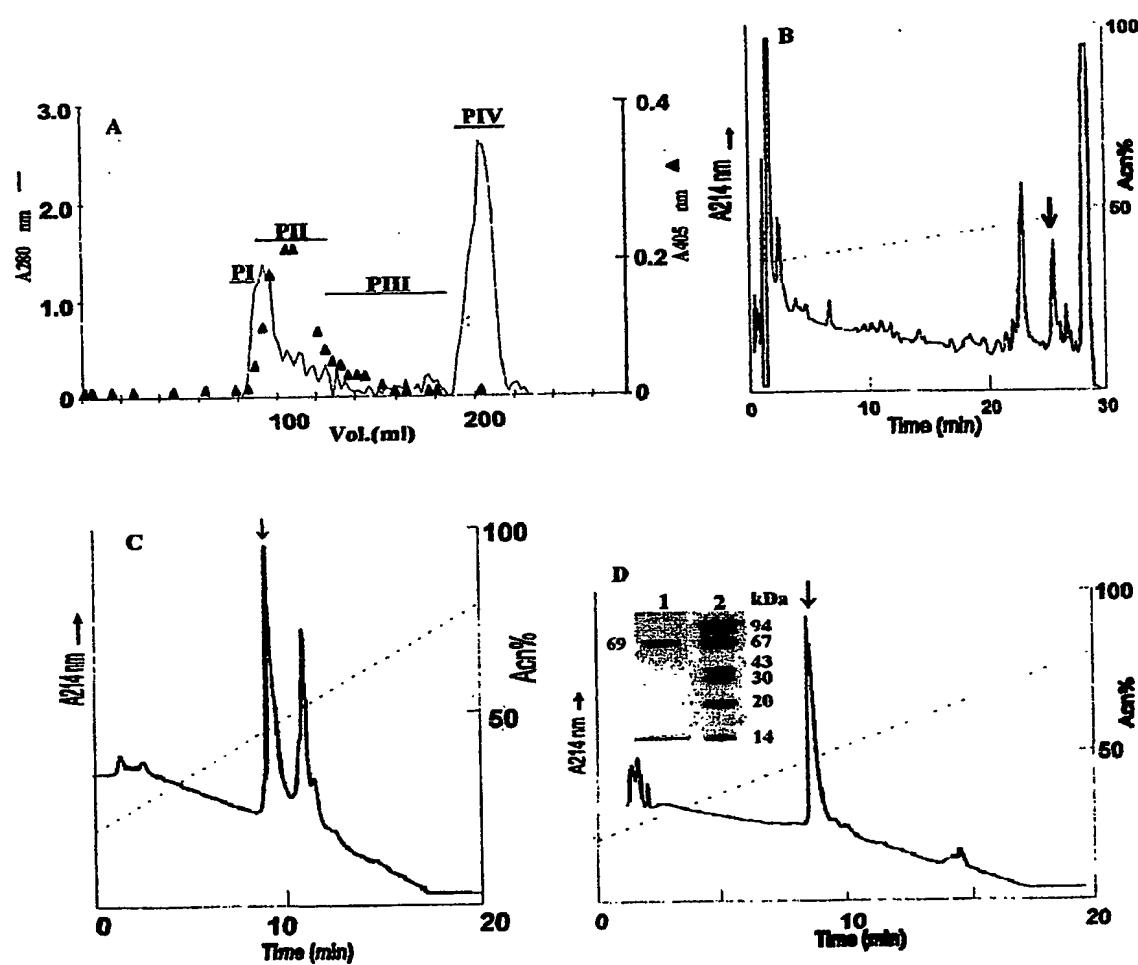


FIGURA 01

BEST AVAILABLE COPY

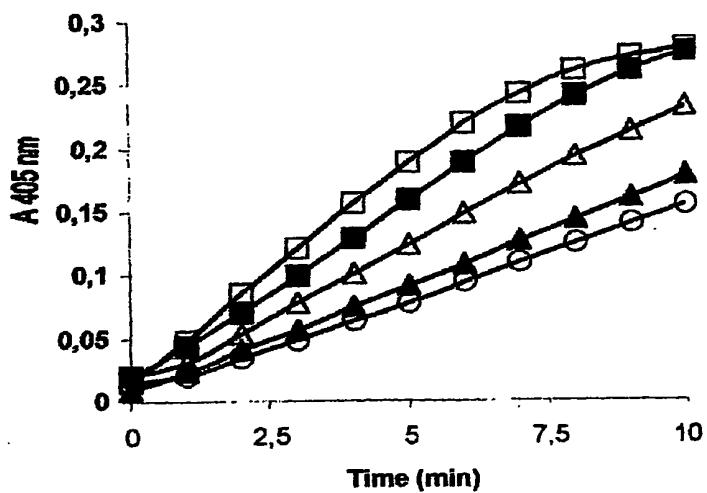


FIGURA 02

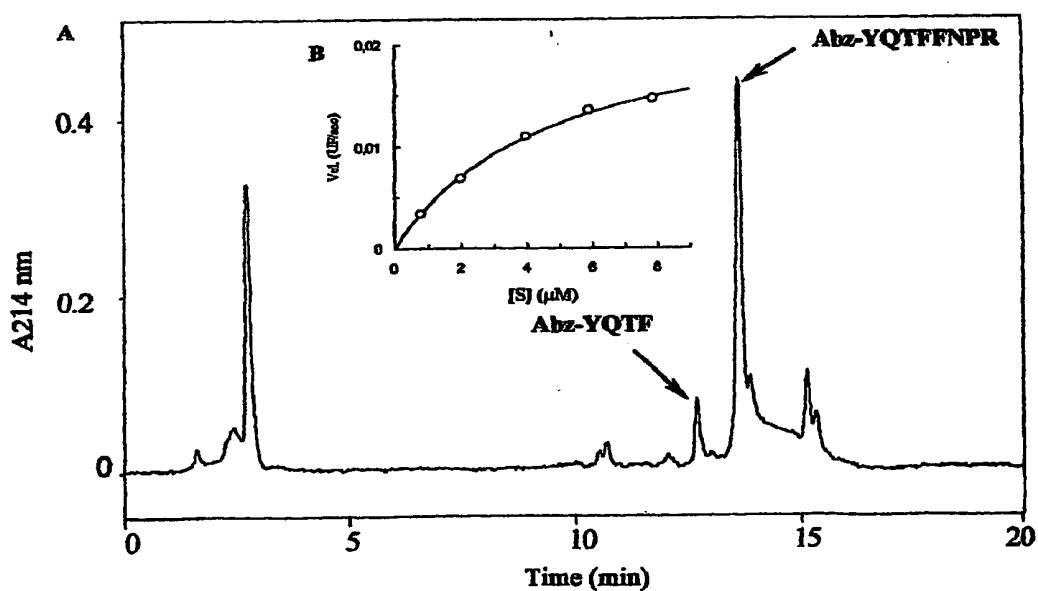


FIGURA 03

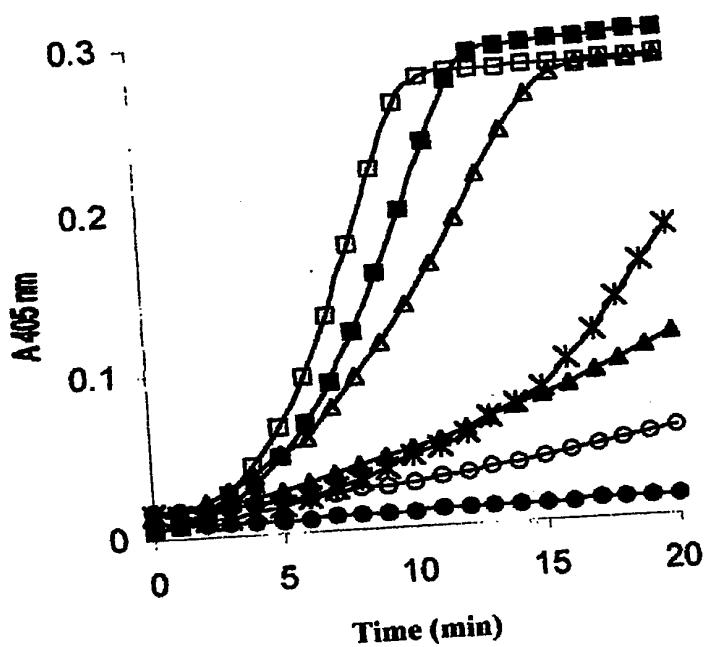


FIGURA 04

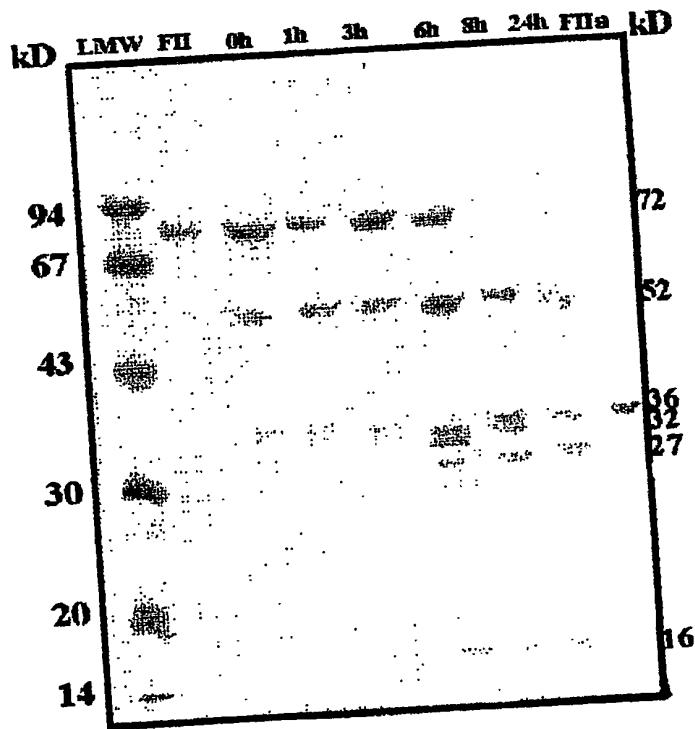
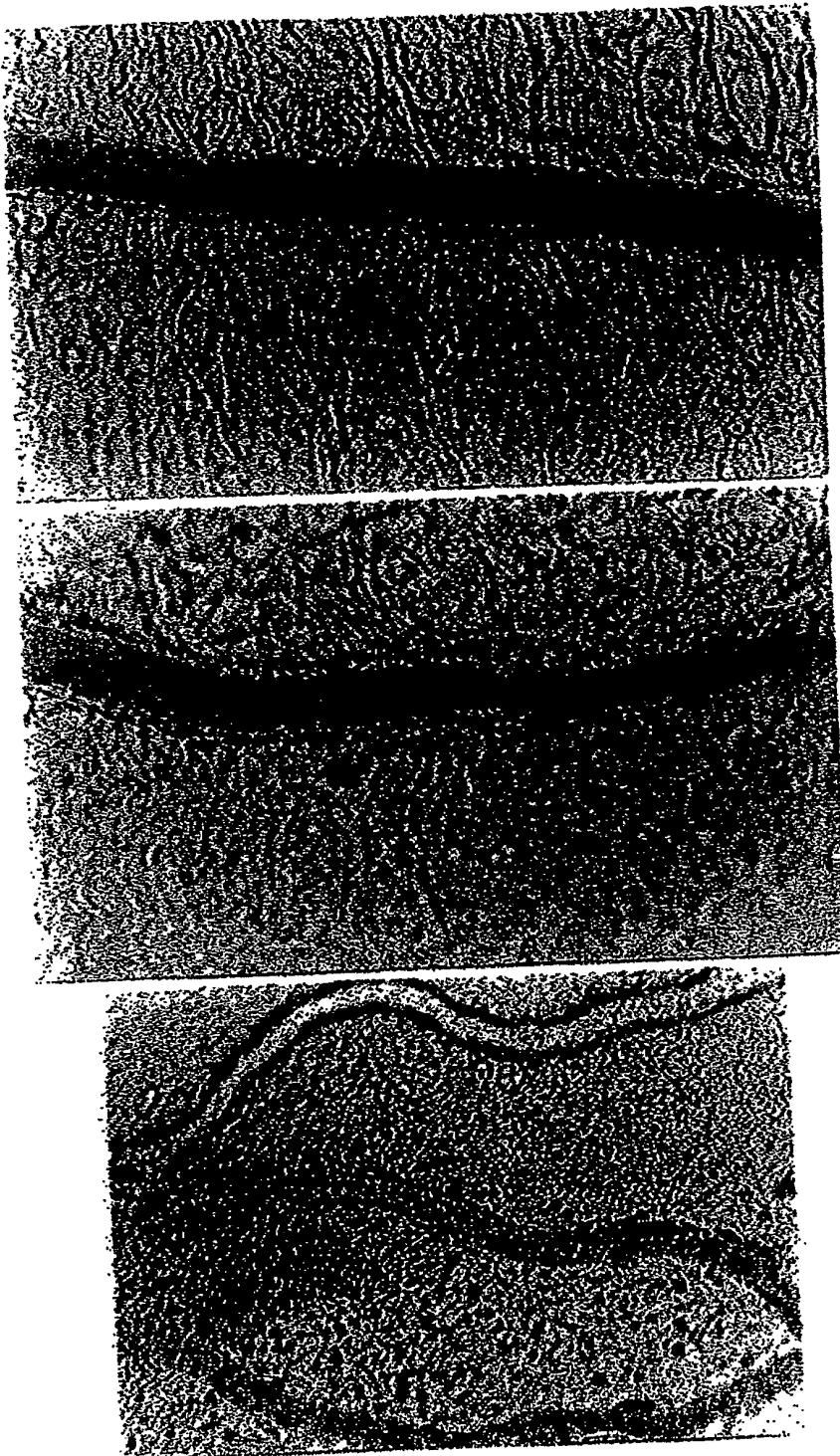


FIGURA 05

BEST AVAILABLE COPY



(66)

FIGURA 06

BEST AVAILABLE COPY

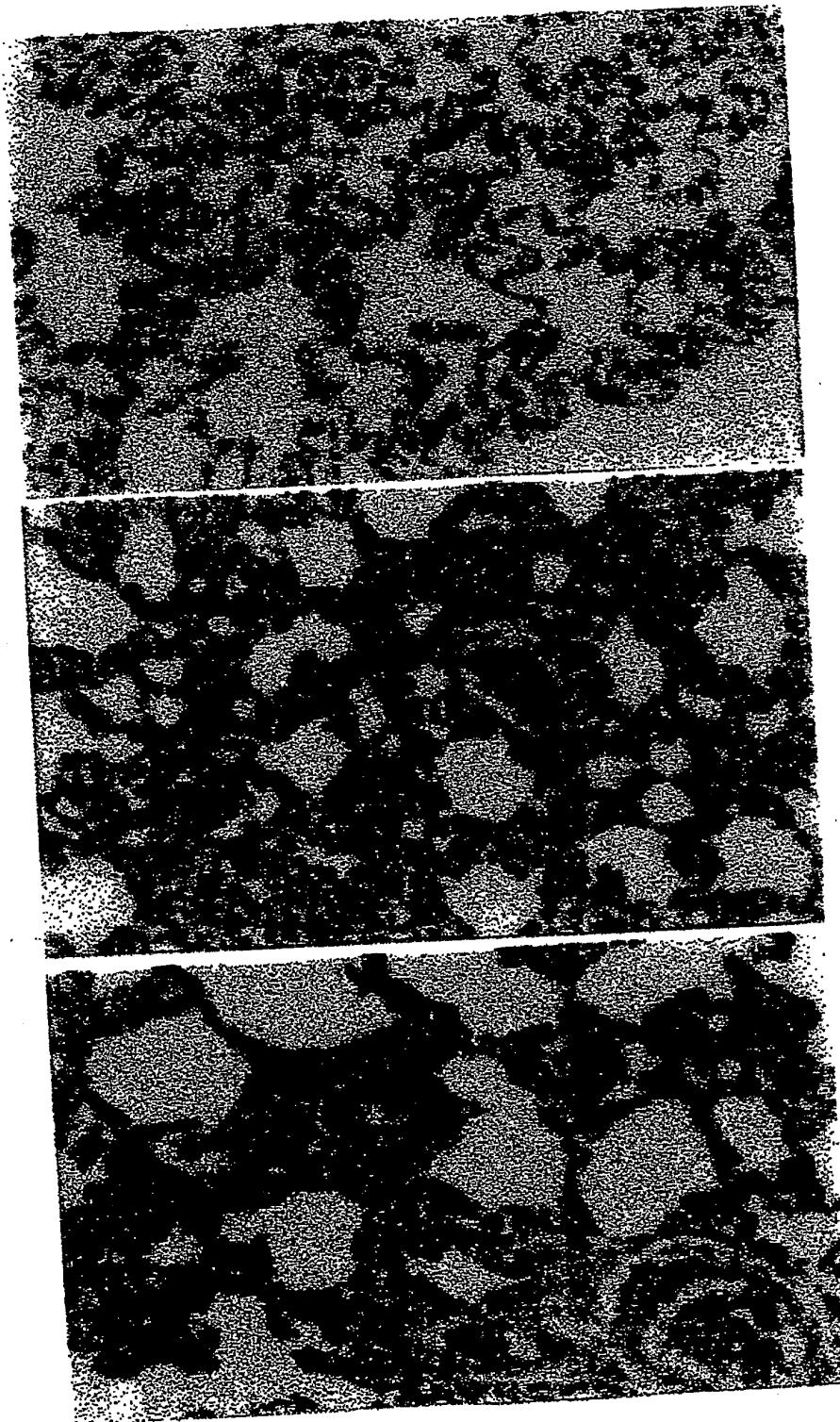
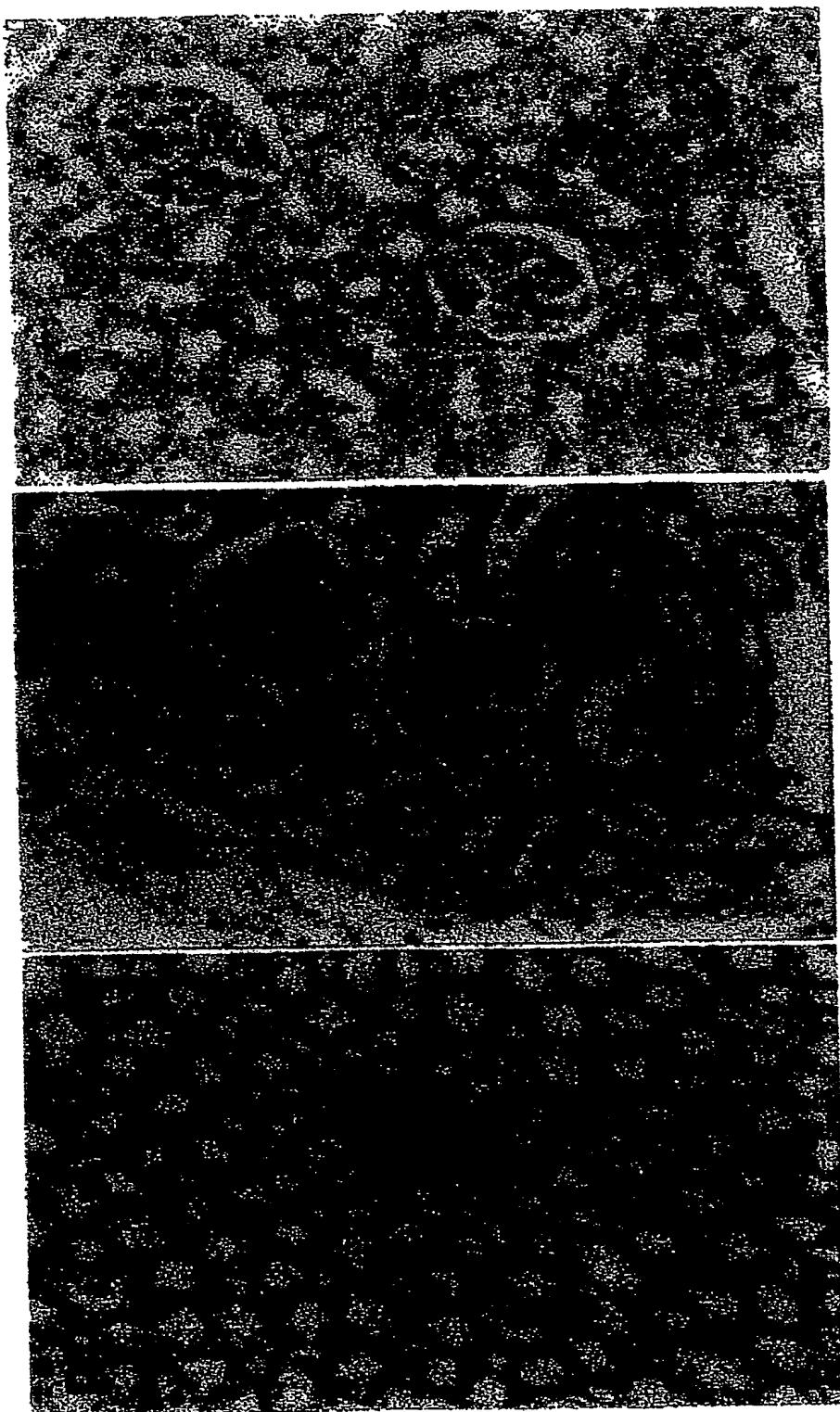


FIGURA 07

BEST AVAILABLE COPY

FOTOCOPIA DE



(68)

FIGURA 08

BEST AVAILABLE COPY

RESUMO

5 "PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS DAS CERDAS DA L. OBLIQUA COM ATIVIDADE ATIVADORA DE PROTROMBINA; PROCESSO PARA DETERMINAÇÃO PARCIAL DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ATIVADOR DE PROTROMBINA; PROCESSO DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ATIVADORA DE PROTROMBINA DA FRAÇÃO II, SEQÜÊNCIA N-TERMINAL E SEQÜÊNCIA DE FRAGMENTOS INTERNOS DA FRAÇÃO ATIVADORA DE PROTROMBINA, ATIVADOR DE 10 PROTROMBINA E USO DO ATIVADOR DE PROTROMBINA".

(69)

A presente invenção refere-se a um processo de purificação de proteínas solúveis das cerdas da *L. obliqua* com atividade ativadora de protrombina; ao processo para determinação parcial da seqüência de aminoácidos do ativador de protrombina; ao Processo de determinação da atividade ativadora de Protrombina da fração II bem como a sequencia n-terminal e sequencia de fragmentos internos da fração ativadora de protrombina ao ativador de protrombina e ao uso do ativador de protrombina partindo-se da homogeneização das cerdas de *L. obliqua*.

25 A presente invenção vem comprovar que um único componente do veneno da *Lonomia obliqua*, Lopap, causa a síndrome hemorrágica diretamente pela ativação de protrombina e, portanto, deveria encaminhar uma terapia no caso de acidentes com *Lonomia obliqua*.

De acordo com a presente invenção o Lopap é um 30 novo ativador de protrombina, o que é um

importante fator responsável pela coagulopatia de consumo, encontrado em pacientes envenenados por *L. obliqua*.

Em doses baixas a proteína purificada, pela sua capacidade de ativar protrombina gerando trombina, retira da circulação de forma controlada o fibrinogênio, transformando-o em microcoágulos de fibrina. Esta diminuição da concentração plasmática de fibrinogênio permite que o tempo de coagulação do sangue se prolongue e, portanto, impede a trombose vascular aguda.

Pelo fato de não possuir atividade proteolítica a proteína manteria a capacidade coagulante do fibrinogênio não consumido no processo. Desta forma a concentração plasmática de fibrinogênio seria diminuída, porém, não haveria predisposição para um estado hemorrágico. Além disso, poderia ser utilizada na confecção de KITS diagnósticos para detecção de protrombina plasmática.

28 JUN 1995 004438

Protocolo

Espaço reservado para etiqueta

(Uso exclusivo do INPI)

PETIÇÃO, RELACIONADA COM PEDIDO, PATENTE OU CERTIFICADO DE ADIÇÃO:

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

1. Interessado:

1.1 Nome: BIOLAB SANUS FARMACÊUTICA LTDA.

1.2 CGC/CPF (se houver): 49.475.833/0003-60

1.3 Endereço completo: Av. dos Bandeirantes, 5386 – Planalto Paulista – São Paulo – SP
– CEP.: 04071-900

1.4 Telefone:

(11)5586-2011

1.5 FAX:

(X) continua em folha anexa

2. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição:

“PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS DAS CERDAS DA L. OBLIQUA COM ATIVIDADE ATIVADORA DE PROTROMBINA; PROCESSO PARA DETERMINAÇÃO PARCIAL DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ATIVADOR DE PROTROMBINA; PROCESSO DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ATIVADORA DE PROTROMBINA DA FRAÇÃO II, SEQUÊNCIA N-TERMINAL E SEQUÊNCIA DE FRAGMENTOS INTERNOS DA FRAÇÃO ATIVADORA DE PROTROMBINA, ATIVADOR DE PROTROMBINA E USO DO ATIVADOR DE PROTROMBINA”

() continua em folha anexa

3. Natureza:

3.1 Invenção

3.1.1 Certificado de Adição

3.2. Modelo de Utilidade

4. Referência:

4.1 Pedido

PI 0200269 - 8

4.2 Patente

4.3 N^º Petição 000994

4.4 Data: 31/01/2002

5. Procurador (74):

5.1 Nome e CPF/CGC: LLC - INFO CONNECTION LTDA. (P. 00340)

5.2 Endereço completo: HERMENGARDA, 60 / 403 – MÉIER – RIO DE JANEIRO –
R.J. – CEP: 20.710-010

5.3 Telefone: (21) 3899-2920 e 3899-2002

5.4 FAX: (21) 3899-2920

6. Apresenta/Requer:

Assinale o(s) itens que se aplica(m) ao seu caso:
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

	O que se requer/apresenta	folhas
X	6.1 Modificações no Relatório Descritivo	47
X	6.2 Modificações nas Reivindicações	06
	6.3 Modificações nos Desenhos	
X	6.4 Modificações no Resumo	02
	6.5 Caducidade da Patente/Certificado de Adição	
	6.6 Contestação de Caducidade/Nulidade	
	6.7 Cópia oficial do pedido depositado.	
	6.8 Cumprimento ou Contestação de Exig. RPI , de	
	6.9 Desarquivamento, arquivado na RPI , de	
	6.1 Documentos de Prioridade	
	6.11 Exame do Pedido com reivindicações	
	6.12 Expedição de Carta Patente / Certificado de Adição	
	6.13 Guia(s) de Recolhimento (uma para cada serviço)	01
	6.14 Manifestação s/ Parecer RPI , de	
	6.15 Nulidade da Patente / Certificado de Adição	
X	6.16 Procuração	01
	6.17 Publicação Antecipada	
	6.18 Recurso contra o Indeferimento	
	6.19 Recurso, (outros)	
	6.20 Renúncia da Patente	
	6.21 Restauração de acordo com o art. 87 da LPI.	
	6.22 Retirada do Pedido	
	6.23 Subsídios ao Exame Técnico	
	6.24 Oferta de Licença	
X	6.25 Outros (especificar): ESCLARECIMENTOS (ANEXOS)	03
X	6.26 Total de folhas anexadas	60

7. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras

Rio, 28 de janeiro de 2003

Local e Data

Leila de Souza Cine Codrel

Assinatura e Carimbo
LLC - INFO CONNECTION LTDA

Agente de Propriedade Industrial - 00340

FOLHA ANEXA

(2)

1. **Interessado: (Continuação)**

1.1 Nome: **FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO – FAPESP**

1.2 CGC/CPF (se houver): **43.828.151/0001-45**

1.3 Endereço completo: **Rua Pio XI, 1500 – Alto da Lapa – São Paulo - SP– CEP.: 05468-901**

1.4 Telefone: **(11)3838-4000** 1.5 FAX:

(3)

1. **Interessado: (Continuação)**

1.2 Nome: **ANA MARISA CHUDZINSKI-TAVASSI**

1.2 CGC/CPF (se houver): **485.879.159-91**

1.3 Endereço completo: **Rua Antonio Gonçalves da Cruz, 60 - Apto.111A – São Paulo – SP – CEP.: 05503-900**

1.4 Telefone: **(11)3873-0253** 1.5 FAX:

ESCLARECIMENTOS

Ref. PI 0200269-8

Serve a presente, para a apresentação tempestiva de novo relatório descritivo, quadro reivindicatório e resumo do pedido PI 0200269-8 depositado em 31/01/2002 sob titularidade de BIOLAB SANUS FARMACÊUTICA LTDA, FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO-FAPESP e ANA MARISA CHUDZINSKI - TAVASSI.

Constatando a ocorrência de um grande número de erros datilográficos no referido pedido, que inclusive poderiam levar o Sr. Examinador a interpretar inadequadamente o pedido, as titulares vêm requerer a V. Sa. que se digne a aceitar as presentes correções, efetuadas com base no disposto no art. 32 da Lei 9279/96 de 14/05/1996, bem como em função do entendimento expresso nas "Diretrizes de Exame de Pedidos de Patente" - item 1.10.1, de dezembro de 2002, publicado na RPI 1670 de 07/01/2003.

As alterações e correções efetuadas correspondem

a:

- Com respeito ao **RELATÓRIO DESCRIPTIVO**

Página 2

Linha 7: Onde se lê He321 leia-se Ile321

Linha 9: Onde se lê rg271 leia-se Arg271

Pag. 7

Linha 10: onde se lê Lopad leia-se Lopap

Linha 11: onde se lê "...é uma serino protease de cadeia simples de 69 kDa..." leia-se "...é uma serino protease de 69 kDa".

Pag14:

Linha 8: a proporção correta é 1:9 e não de 9:1

Linha 24: onde se lê "...acetonitrila:solvente A (9:1) com solvente B", leia-se "...acetonitrila:solvente A (9:1) como solvente B" e o mesmo ocorre na pag. 20, linha 26.

Pag. 21

Linha 11: o correto é (PII-4R2)

Pag 31

Linha 21: Substituir "...Lopap diretamente ativado por protrombina mostrou um aumento da atividade..." por "...Lopap ativa diretamente a protrombina e mostrou um aumento desta atividade..."

Pag 46

A legenda da figura 4 não deve apresentar o primeiro quadrado cheio, **o qual foi retirado**.

- Com respeito às REIVINDICAÇÕES:

Na reiv. 1 no item k onde se lê "...no item (e)...", leia-se, "... no item (f)..."
Na reiv. 2 a proporção correta é 1:9 e não 9:1
Na reiv. 6 onde se lê com solvente B...", leia-se "...como solvente B..."

- Com respeito ao RESUMO.

Na última linha escreva-se: "... para detecção de desprotrombinemias." ao invés de "...protrombina plasmática."

Cabe adicionalmente esclarecer que as seqüências de fragmentos (agora em total de quatro, já que uma delas foi dividida em duas) apresentaram erros datilográficos que estão sendo corrigidos pela presente, nas páginas 15, 16 e 29 do relatório descritivo e nas reivindicações 9 e 12.

São elas:
Fragmento I (KSHVYTVFPG);

Fragmento II (KSNQHRVNIWILSRTK);
Fragmento III (VRAGHVE) e
Fragmento IV (FDQSKFVETDFSEKACFF)

Na Página 40, a partir da linha 24 deve ser escrito: "...enquanto os fragmentos I, II, III e IV apresentam respectivamente 36,4%, 37,5%, 42,9% e 55,5% de identidade..."

Na expectativa da pronta aceitação da presente e o respectivo deferimento do pedido, somos,

Atenciosamente,

Leila da Luz Lima Cabral
LEILA DA LUZ LIMA CABRAL
LLC-INFO CONNECTION LTDA.
Diretora
LLC-INFO CONNECTION LTDA
Agente de Propriedade Industrial - 00340

"PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS DAS CERDAS DA L. OBLIQUA COM ATIVIDADE ATIVADORA DE PROTROMBINA; PROCESSO PARA DETERMINAÇÃO PARCIAL DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ATIVADOR DE PROTROMBINA; PROCESSO DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ATIVADORA DE PROTROMBINA DA FRAÇÃO II, SEQÜÊNCIA N-TERMINAL E SEQÜÊNCIA DE FRAGMENTOS INTERNOS DA FRAÇÃO ATIVADORA DE PROTROMBINA, ATIVADOR DE PROTROMBINA E USO DO ATIVADOR DE PROTROMBINA".

10 Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a um processo de purificação de proteínas solúveis das cerdas da *L. obliqua* com atividade ativadora de protrombina ; e ao processo para determinação parcial da seqüência de aminoácidos do ativador de protrombina; ao Processo de determinação da atividade ativadora de Protrombina da fração II bem como ao Ativador de protrombina e ao uso do ativador de protrombina.

20 Antecedentes da Invenção

A protrombina é uma proteína plasmática, dependente da vitamina K, que é envolvida na coagulação do sangue. A ativação da protrombina é catalisada através do complexo protrombinase que é composto pelo Fator Xa, Fator Va, fosfolipídeos e íons cálcio e ocorre através da clivagem (em seqüência) de duas ligações peptídicas da molécula

da protrombina (Mann K G. *Prothrombin and Thrombin*. In: Colman RW, Marder VJ, Salzman EW, Hirsh J eds. *Haemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice*. Philadelphia: J. B. Lippincott; 1994. P 184-99).

A primeira clivagem ocorre entre as ligações Arg.320 e Ile321, e esta hidrólise leva à formação de um ativador intermediário, a meizotrombina. A Segunda clivagem ocorre entre as ligações Arg271 e Thr272, e libera os fragmentos 1, 2 e a serino protease α -trombina (Mann K G. *Prothrombin and Thrombin*. In: Colman RW, Marder VJ, Salzman EW, Hirsh J eds. *Haemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice*. Philadelphia: J. B. Lippincott; 1994. P 184-99).

Na ausência de fosfolipídeos, a protrombina pode ser ativada por concentrações fisiológicas do fator Xa, no entanto, a velocidade de ativação é 5 ordens de grandeza menor que a ativação pelo complexo protrombinase (Mann KG. *Membrane-bound enzyme complexes in blood coagulation*. *Prog. Hemost Thromb.* 1984;7:1-23.), sendo que o mecanismo de ativação ocorre através da formação de pretrombina (Mann KG. *Membrane-bound enzyme complexes in blood coagulation*. *Prog. Hemost Thromb.* 1984;7:1-23.) ao invés da meizotrombina (Heldebrandt CM, Butkowski RJ, Bajaj SP, Mann KG. *The activation of prothrombin*. *H.*

Partial reactions, physical and chemical characterization of the intermediates of activation. *J Biol. Chem.* 1973; 248: 7149-63).

A α -trombina é a serino protease 5 responsável pela conversão do fibrinogênio em fibrina, ativação dos fatores V, VIII, e XIII, e agregação plaquetária (Mann KG, Downing MR. Thrombin generation. In: Lundblad RL, Fenton JW, Mann KG, Eds. *Chemistry and Biology of Thrombin*. 10 Ann Arbor Science; 1977. Pp. 11-21; Lundblad RL, Kingdon HS, Mann KG. *Thrombin. Methods Enzymol.* 1976; 45:156-76).

Muitas serpentes venenosas contêm 15 proteínas pró-coagulantes que são capazes de ativar zimogênios, os quais participam da coagulação do sangue.

Tendo em vista que os mecanismos pelos 20 quais as enzimas de venenos ativam os fatores da coagulação de forma diferente das enzimas encontradas em mamíferos, os ativadores de venenos podem fornecer informações adicionais sobre os mecanismos de ativação dos fatores da coagulação. Os ativadores de protrombina do veneno são 25 classificados como Tipo 1 (p.e. ecarina), Tipo 2 (p.e. ativador de *Notechis scutatus*), 3 (p.e. *Oxyuranus scutellatus*), e 4 (p.e. ativador de *Agkistrodon acutus*) dependendo da sua interação com os componentes do complexo protrombinase (Rosing J, Tans G. Inventory of exogenous

prothrombin activators. Thromb. Haemost. 1991; 65 (5): 627-30).

Ativadores do tipo 1 não dependem dos componentes do complexo protrombinase, Tipo 2 dependem de fosfolipídeos , Ca²⁺ e Fator Va, Tipo 3 dependem de fosfolipídeos e Ca²⁺ . Ativadores do Tipo 4 podem necessitar ou não dos componentes do complexo protrombinase e podem clivar ligações peptídicas na protrombina sem convertê-la em seus produtos com atividade catalítica (e.g. trombina ou meizotrombina).

Os ativadores do Tipo 4 e a trombina hidrolisam a protrombina nas mesmas posições (Arg 155-Ser 156 e Arg 284-Thr 285), gerando fragmentos similares ou idênticos para pretrombina 1 e pretrombina 2 (*Rosing J, Tans G. Structural and functional properties of snake venom prothrombin activators. Toxicon. 1992; 30: 1515 - 27.*)

Na hemolinfa bruta da *Lonomia achelous* dois tipos de atividade de ativadores de protrombina foram descritos. Um deles é capaz de ativar diretamente a protrombina, independentemente do complexo protrombinase, e o outro é estimulado por fator v, íons cálcio, e fosfolipídeos (*Guerrero BAG, Arocha-Pinango. Activation of human prothrombin by the venom of Lonomia achelous (Cramer) caterpillars. Thrombos. Res. 1992;66:169-77*).

No extrato bruto das cerdas de *L. obliqua* uma atividade procoagulante foi descrita a qual é devida a ativadores de protrombina e Fator X (Kelen EMA. Duarte A.C, Tomy SC, Sano-Martins IS, 5 Castro SCB, Guerrero B, Arocha-Pinango CL. Acquired haemorrhagic syndrome from contact with a caterpillar (*Lonomia obliqua* Walker 1855, Saturniidae). *Toxicon* 1996; 34:146., Donato JL, Moreno RA, Hyslop S. Duarte AC, antunes E, Le 10 Bonniec BF, Rendu F, Nucci G. *Lonomia obliqua* caterpillar spicules trigger human blood coagulation via activation of factor X and prothrombin. *Thromb. Haemost.* 1998; 79: 539-42).

O veneno de *Lonomia obliqua* causa uma 15 severa coagulopatia de consumo, a qual pode levar à síndrome hemorrágica. O extrato bruto das cerdas apresenta uma atividade procoagulante devido à ativação do fator X e da protrombina.

Desde 1989, uma síndrome hemorrágica 20 causada pelo contato com a taturana *Lonomia obliqua* tornou-se uma epidemia no Brasil e casos fatais devido a complicações renais e hemorragias cerebrais têm sido descritos. Os acidentes afetam o mecanismo da coagulação, resultando numa 25 drástica diminuição do fibrinogênio, e dos fatores V e XIII. Além disso, ocorre a diminuição dos níveis de plasminogênio de α -2-antiplasmina e da atividade da proteína C, um inibidor natural da

coagulação. Estes dados indicam uma coagulopatia de consumo com fibrinólise.

Os sintomas decorrentes dos acidentes provocados pela lagarta *Lonomia obliqua* são:
5 dermatite urticante, equimoses e hematomas (espontâneos ou provocados por traumas), hemorragias das cavidades mucosas (gengivas, hemorragia nasal), hematúria, sangramento de feridas recentes, e hemorragias abdominais,
10 pulmonares, glandulares e cerebrais. Casos fatais relatados foram atribuídos a complicações renais e hemorragias cerebrais.

Estudos anteriores sobre acidentes pelo contato com *L. achelous* na Venezuela sugeriam que
15 nestes casos a síndrome hemorrágica poderia ser explicada por uma grave síndrome fibrinolítica associada a uma coagulação intravascular disseminada. Embora os sintomas clínicos do envenenamento pela *Lonomia obliqua* e *Lonomia obliqua* serem muito similares, os resultados dos trabalhos executados, nos laboratórios, pelos pesquisadores da presente invenção demonstram e
20 sugeriram uma interpretação diferente para esta última, atribuindo o principal mecanismo molecular
25 da síndrome hemorrágica à formação de trombina.

Mais especificamente, nos últimos dez anos tem sido relatado na região Sul do Brasil um crescimento de ocorrências de síndrome hemorrágica humana causada pelo contato com a lagarta *Lonomia*

obliqua. O veneno causa uma grave coagulopatia de consumo, que pode resultar numa síndrome hemorrágica.

A presente invenção parte do princípio de que um extrato bruto preparado com cerdas da *Lonomia obliqua* ativou tanto a protrombina quanto o Fator X. Em envenenamentos acidentais, ocorre a apresentação de alterações na coagulação e em fatores fibrinolíticos.

Lopap (*Lonomia obliqua* *protrombin activator protease*) é um serino protease de 69 kDa isolada do extrato das cerdas da lagarta *Lonomia obliqua*, a qual tem sua atividade aumentada por Ca^{2+} , é capaz de converter diretamente protrombina em trombina de forma dose-dependente. O seu mecanismo de ação é similar ao do Fator Xa, formando fragmentos de pretrombina na via independente do complexo protrombinase. Lopap hidrolisa um substrato fluorogênico baseado na seqüência da protrombina na mesma ligação peptídica pela trombina.

A presente invenção também parte da verificação da caracterização biológica da serino protease ativadora da protrombina isolada do extrato bruto das cerdas da *Lonomia obliqua*, a qual, reproduziu os efeitos do veneno total na coagulação do sangue e formação de trombos nos ratos.

De acordo com a presente invenção o Lopap purificado foi obtido de extrato bruto das cerdas de *Lonomia obliqua* onde as ditas cerdas foram extraídas em PBS, e o ativador de protrombina foi purificado por gel de filtração, e por duas etapas cromatográficas em fase reversa. A atividade ativadora de protrombina foi monitorada empregando o substrato cromogênico, S-2238 baseado na seqüência de protrombina, e clivado pela trombina.

A presente invenção vem comprovar que um único componente do veneno da *Lonomia obliqua*, Lopap, causa a síndrome hemorrágica diretamente pela ativação de protrombina e portanto deveria encaminhar uma terapia no caso de acidentes, com *Lonomia obliqua*.

A avaliação dos efeitos da injeção de Lopap em ratos, analisando os parâmetros de coagulação, o comportamento dos vasos da microcirculação e os distúrbios em órgãos distintos, quando doses de 100 µg/kg foram injetadas, e o efeito monitorado por 1 hora, demonstrou que o sangue tornou-se incoagulável, a contagem de plaquetas decresceu aproximadamente 40% e a indução da agregação plaquetária induzida por colágeno no sangue total foi completamente abolida. Os números de eritrócitos e de leucócitos no sangue total não foram alterados, apesar da alta concentração de toxina. Por outro lado, intensa parada venular e áreas hemorrágicas foram

observadas. A geração da trombina intravascular pode explicar a diminuição da contagem das plaquetas e a hipoagregação de plaquetas após a injeção de Lopap nos ratos, sendo a trombina o principal e mais ativo agonista plaquetário.

Observando a rede microcirculatória visualizou-se coágulos de fibrina em vasos poscapilares 5 min após a injeção de Lopap. As alterações foram proeminentes 1 h após esta administração, quando parada de alguns vasos e intensas áreas hemorrágicas se tornaram aparentes. Este fenômeno pode estar implicado aos hematomas observados na maioria dos pacientes humanos envenenados. Análises histológicas de diversos órgãos em animais experimentais foram realizadas 1 hora após a injeção de Lopap. Foram encontradas alterações somente nos tecidos dos pulmões e rins, sendo este de maior importância, já que áreas hemorrágicas e necróticas foram encontradas. Pacientes que desenvolvem médio ou grave envenenamento geralmente apresentam hematúria e às vezes deficiência renal, que consequentemente podem levar à morte. As lesões nos rins encontrados nos ratos experimentais podem ser causadas pela hemorragia e/ou pelo depósito de fibrina no glomérulo. Talvez durante um tempo maior de envenenamento, os microtrombos e os sinais de congestão em outros órgãos, incluindo o

sistema nervoso central, poderiam se tornar aparentes.

Baseado nestas verificações a presente invenção sugere que Lopap é um novo ativador da protrombina, que parece ser um fator muito importante responsável pelos principais sintomas encontrados em pacientes humanos envenenados por *Lonomia obliqua*.

Para avaliar se um ou mais ativadores de protrombina da toxina da taturana poderiam estar envolvidos, as proteínas solúveis das cerdas da *Lonomia obliqua* foram purificadas por cromatografias de gel-filtração e fase reversa (HPLC). A ativação da protrombina foi monitorada usando-se a protrombina e o substrato cromogênico específico para trombina S2238, da Chromogenix. Os produtos da hidrólise da protrombina foram também identificados por SDS-PAGE. Uma proteína de 69 kDa apresentou-se como uma serino protease ativada por íons cálcio, a qual converte diretamente protrombina em trombina e pode ser incluída no grupo 1 dos ativadores de protrombina "Lonomia obliqua Phrothrombin Activator Protease" (Lopap), foi purificada até a homogeneidade e a sua seqüência de aminoácidos não apresenta homologia com outros ativadores de protrombina nem com nenhuma outra serino protease.

Os experimentos realizados "in vivo" mostraram que injetando-se em ratos a proteína

purificada são obtidos os mesmos efeitos causados pelo extrato bruto das cerdas, ocorrendo dessa forma uma incoagulabilidade do sangue que apresenta-se de forma dose-dependente. Esta observação foi corroborada pela observação da rede microcirculatória do músculo cremaster após a injeção da proteína usando-se a técnica da microscopia intravital. Os dados obtidos demonstraram que a infusão de Lopap produz uma coagulação intravascular e trombose em vasos pós-capilares, o qual freqüentemente contribui para o dano orgânico. Seguramente o Lopap é o principal fator que causa a coagulopatia de consumo em acidentes por *L. obliqua*.

Um principal aspecto da presente invenção está relacionado ao Processo de purificação de proteínas solúveis das cerdas da *L. obliqua* com atividade ativadora de protrombina partindo-se da homogeneização das cerdas de *L. obliqua* em Tampão salina fosfato (PBS), num pH entre 7.4 a 8.0 seguido de centrifugação a 2500g numa temperatura de 4° a 10° C durante 30 a 60 minutos a fim de se obter um extrato bruto com atividade ativadora de protrombina. Segue-se, então, a purificação do ativador de protrombina a partir de 50 a 200 mg de proteína total em 2 a 10 ml de extrato bruto por cromatografia de gel filtração em resina Sephadex G-75, eluída em tampão de Tris-HCL 20 a 50 mM contendo NaCL 50 a 100 mM e benzamidina 2 a 5 mM

num pH 7.4 a 8.0 com fluxo 1,0 ml/h. Coleta-se, então, frações de 1 a 3 ml e procede-se o monitoramento do perfil protéico da cromatografia por absorbância UV em 280 nm.

5 A protrombina é ativada com o material obtido nos picos protéicos usando-se o substrato colorimétrico S-2238 específico para trombina a fim de se obter o pico PII que deve conter a ação ativadora de protrombina. Submete-se o obtido ativo à cromatografia de fase reversa através da coluna C4 no sistema analítico de HPLC empregando como solventes: A: 0,1% TFA em água (equilíbrio) e B: 10% solvente A e acetonitrila na proporção 1:9 (eluição) ou seja, solvente B: 100ml de solvente 15 A adicionados de 900 ml de acetonitrila. Utiliza-se gradiente de 35-50% de solvente B por 30 minutos e procede-se à detecção protéica a 214 ou 280 nm em monitor de UV. Segue-se a coleta de frações de 0.5 - 1.0 ml e liofiliza-se 20 imediatamente para eliminar a acetonitrila.

A seguir, ressuspende-se as amostras liofilizadas em tampão Tris-HCL 20 a 50 mM contendo NaCL 50 a 100 mM pH 7.4 a 8.0 e testase, então, a atividade ativadora de protrombina 25 das frações com o material obtido nos picos protéicos usando o substrato colorimétrico S-2238 específico para trombina.

O pico ativo está nas frações eluídas entre 42 a 44% de solvente B.

Recromatografa-se a fração ativa em cromatografia de fase reversa através da coluna C4 no sistema analítico de HPLC empregando-se como solventes: A: 0,1% TFA em água (equilíbrio) e B: 5 10% solvente A e acetonitrila na proporção 1:9 (eluição) ou seja, solvente B: 100ml de solvente A adicionados de 900 ml de acetonitrila utilizando gradiente entre 20 - 80% de solvente B, durante 20 minutos. Procede-se à detecção protéica a 214 ou 10 280 nm em monitor de UV. Coletam-se frações de 0.5 - 1.0 ml e liofiliza-se imediatamente para eliminar a acetonitrila. Ressuspende-se as amostras liofilizadas em tampão Tris-HCL 20 a 50 mM contendo NaCL 50 a 100 mM pH 7.4 a 8.0. Testa- 15 se a atividade ativadora de protrombina das frações com o material obtido nos picos protéicos usando o substrato colorimétrico S-2238 específico para trombina e observa-se que o pico ativo está nas frações eluídas entre 42 a 44% de solvente B.

20 O material purificado pode se submetido a uma eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS para avaliação da pureza. O gel pode ser corado por coomassie brilhante blue.

A dosagem de proteína final pode ser 25 avaliada por dosagem de proteína por métodos colorimétricos ou por Absorbância em 280 nm.

O sistema analítico de HPLC empregado é da Merck-Hitachi (modelo D-2500) e o monitor é da Shimadzu UV (modelo SPD-6AV).

No processo da presente invenção são empregados os seguintes solventes para eluição:

- solvente A: 0,1% TFA em água e
- solvente B: 10% solvente A e acetonitrila na proporção 1:9 ou melhor, 100ml de solvente A adicionados de 900 ml de acetonitrila .

Para realizar a purificação no HPLC utiliza-se um gradiente de 35-50% de solvente B.

Uma outra modalidade da invenção está relacionada ao Processo para determinação parcial da seqüência de aminoácidos do ativador de protrombina onde de 500 - 1000 pM do purificado é submetido à degradação por 10 pmol de tripsina em 100mM Tris-HCl, pH 8.0 contendo 0.02.% de CaCl₂ durante 18 horas a 37°C finalizando a reação com 15 % (v /v) de ácido fórmico. Neste processo, os fragmentos obtidos são separados em HPLC utilizando-se uma coluna C4, solventes de eluição a base de 0,1% de TFA em água (solvente A) e acetonitrila: solvente A (9:1) como solvente B. Para a separação no HPLC utilizou-se um gradiente de 0-100% de solvente B com fluxo de 1.0 ml/min durante 30min.

De acordo com o processo da presente invenção determinou-se a seqüência de quatro peptídeos internos e do N-terminal. A porção N-terminal contém 46 resíduos (DVVIDGACPDMKAVSKFDMNAYQGTWYEIKKFPVANEANGDCGSVE)

de aminoácidos e os fragmentos de peptídeos internos são:

- Fragmentos I (KSHVYTVPGFA) ;
- Fragmento II (KSNQHRVNIWILSRTK) ;
- 5 - Fragmento III (VRAGHVE)
- Fragmento IV (FDQSKFVETDFSEKACFF) .

A seqüência obtida corresponde a cerca de 15% da proteína completa e massa molecular de 69KDa.

Uma outra modalidade da invenção relaciona-se ao processo de determinação da atividade ativadora de protrombina da fração II compreendendo a pré-incubar 15 a 300nM da fração purificada durante 10 minutos a 37° C com 90 pM de 15 protrombina na presença de 5mM de CaCl₂ para volume final de 500µL na presença de 50mM de Tris-HCl, 100mM de NaCl, pH 8 e 3 e 150 mM de imidazol, a adição de 40 µM do substrato cromogênico S-2238 (H-D-phenylalanyl-L-pipicolyl-L-arginine-p-nitroanilide dihydrochloride), à mistura de incubação e acompanhar espectrofotometricamente a 405 nm durante 10 min. a hidrólise do substrato cromogênico.

A invenção também se relaciona a seqüência N-terminal e seqüência de fragmentos internos da fração ativadora de protrombina caracterizada por conter a porção N-terminal com 46 resíduos (DVVIDGACPDMKAVSKFDMNAYQGTWYEIKKFPVANEANGDCGSVE) de aminoácidos e os fragmentos de peptídeos

internos são: Fragmentos I (KSHVYTVPGFA); Fragmento II (KSNQHRVNIWILSRTK); Fragmento III (VRAGHVE) e Fragmento IV (FDQSKFVETDFSEKACFF) sendo que a seqüência obtida corresponde a cerca de 15% da proteína completa e massa molecular de 69 Kda.

Uma outra modalidade da invenção está relacionada ao ativador de protrombina contendo a seguinte estrutura: A proteína purificada é caracterizada como uma serino protease que hidrolisa a protrombina gerando Fragmentos 1, 2 e trombina.

E por fim, a invenção está voltada ao uso do ativador de protrombina como um desfibrilante em estados pró-trombóticos.

Em doses baixas a proteína purificada, pela sua capacidade de ativar protrombina gerando trombina, retira da circulação de forma controlada o fibrinogênio, transformando-o em microcoágulos de fibrina. Esta diminuição da concentração plasmática de fibrinogênio permite que o tempo de coagulação do sangue se prolongue e, portanto, impede a trombose vascular aguda.

Pelo fato de não possuir atividade proteolítica a proteína manteria a capacidade coagulante do fibrinogênio não consumido no processo. Desta forma a concentração plasmática de fibrinogênio seria diminuída, porém não haveria predisposição para um estado hemorrágico. Além

disso, poderia ser utilizada na confecção de KITS diagnósticos para detecção de protrombina plasmática.

Materiais e Métodos empregados:

5 Reagentes:

E-64 (trans-epoxysuccinil-L-leucilamido-(4-guanidino-butano)-protrombina, EDTA (ácido etíleno-diaminotetraacético), PMSF (fenilmethylsulfonil fluoreto), NPGB (p-Nitrofenil-p"-guanidinobenzoato) e tripsina foram obtidos da Sigma; S-2238 (H-D-fenilalanil-L-picolil-L-arginina-p-nitroanilida dihidrocloreto) e S-2765 (N- α -benzil-oxicarbonil-D-arginil-L-glicilLarginina-p-nitroanilida) foram obtidos da Chromogenix.

Todos os outros reagentes utilizados foram da melhor procedência possível disponível no mercado. A resina Sephadex G-75 foi adquirida da Pharmacia, a coluna C₄ (5 μm , 4., 6x250mm) da J.T. Baker, e a coluna C₁₈ ($\mu\text{Bondapack}$ 10 μm ; 22,5 mmx250mm) foi adquirida da Millipore Corp. O substrato peptídico fluorescente Abz-YQTFFNPRTFGSQ-EDDnp. (Abz= *ortho* - aminobenzoic acid; EDDnp= N-[2,4-dinitrophenyl] ethylenediamine), cuja seqüência é baseada na seqüência da protrombina foi sintetizado no Departamento de Biofísica da Universidade Federal

de São Paulo, Brasil, de acordo com procedimentos descritos previamente.

Os exemplos ilustrativos apresentados a seguir servirão para melhor descrever a presente 5 invenção.

Entretanto, os dados e procedimentos ilustrativos referem-se meramente a algumas modalidades de concretização da presente invenção e não devem ser tomados como limitativos do escopo 10 da mesma.

Exemplos Ilustrativos

Exemplo 1:

PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS DAS CERDAS DA L. OBliqua COM ATIVIDADE ATIVADORA DE PROTROMBINA:

Cerdas de *L. obliqua* foram homogeneizadas 15 em Tampão salina fosfato (PBS), pH 7.4-8.0, centrifugadas a 2500g 4° a 10° C durante 30 a 60 minutos obtendo-se um extrato bruto com atividade ativadora de protrombina. O ativador de 20 protrombina foi purificado a partir de 50 a 200 mg de proteína total em 2 a 10 ml de extrato bruto por cromatografia de gel filtração em resina Sephadex G-75, eluída em tampão de Tris-HCl 20 a 50 mM contendo NaCl 50 a 100 mM e benzamidina 2 a 25 5 mM, pH 7.4 a 8.0 com fluxo 1,0 ml/h. Frações de 1 a 3 ml foram coletadas e monitorado o perfil protéico da cromatografia por absorbância UV em

280 nm. A protrombina foi ativada com o material obtido nos picos protéicos usando o substrato colorimétrico S-2238, específico para trombina.

Foi obtido o pico PII que deve conter a
5 ação ativadora de protrombina e submetido à cromatografia de fase reversa através da coluna C4 no sistema analítico de HPLC empregando como solventes: A: 0,1% TFA em água (equilíbrio) e B: 10% solvente A e acetonitrila na proporção 1:9
10 (elução). Proceder à detecção protéica a 214 ou 280 nm em monitor de UV, coletar frações de 0.5 - 1.0 ml e liofilizar imediatamente para eliminar a acetonitrila, ressuspender as amostras liofilizadas em tampão Tris-HCl 20 a 50 mM
15 contendo NaCl 50 a 100 mM pH 7.4 a 8.0, testar atividade ativadora de protrombina das frações eluídas entre 42 a 44% de solvente B, recromatografar a fração ativa c utilizando gradiente entre 20 - 80% de solvente B, durante 20
20 minutos.

O material purificado pode se submetido a uma eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS para avaliação da pureza. O gel pode ser corado por coomassie brilhante blue.

25 A dosagem de proteína final pode ser avaliada por dosagem de proteína por métodos colorimétricos ou por Absorbância em 280 nm.

Exemplo 2:

PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS DAS CERDAS DA L.
OBLIQUA COM ATIVIDADE ATIVADORA DE PROTROMBINA.

As taturanas *L. obliqua* foram anestesiadas em atmosfera de CO₂ e suas cerdas foram removidas 5 e mantidas no gelo. O extrato bruto foi obtido a partir de 9,9g de cerdas que foram homogeneizadas em PBS, pH 7,4 e centrifugadas a 2500 g a 4° C durante 10 minutos. O ativador de protrombina foi purificado a partir do extrato bruto (103,5 mg em 10 12,0 ml) através de cromatografia de gel filtração (coluna: 100x1,8 cm Sephadex G-75), que foi eluída em tampão tris-HCl 50 mM, NaCl 100mM, benzamidina 5 mM, pH 8,0, com fluxo de 15 ml/h. Foram coletadas frações de 2,0 ml e o perfil protéico da 15 cromatografia foi monitorado por absorbância UV em 280 nm, e a ativação de protrombina foi verificada usando-se o substrato colorimétrico específico para trombina. O pico PII (conteúdo protéico: 20 5,68mg), foi submetido a uma cromatografia de fase reversa empregando-se a coluna C₄ no sistema analítico de HPLC da Merck-Hitachi 9 modelo D-2500, e um monitor de UV da Shimadzu UV (modelo SPD-6AV) foram utilizados para detecção protéica a 214 nm. Os solventes para eluição foram TFA 0,1% 25 em H₂O (solvente A), e acetonitrila: solvente A (9:1) como solvente B. A purificação no HPLC foi realizada usando-se um gradiente de 35-50% de solvente B com fluxo de 1,0 ml/min durante 30 min. Os picos coletados foram imediatamente

lioofilizados. O pico protéico que apresentou atividade ativadora da protrombina foi ressuspensiondo em tampão tris-HCl 50 mM, NaCl 100mM, pH 8,0, e submetido a uma nova 5 cromatografia usando um gradiente de 20 - 80% de solvente B, fluxo de 1,0 ml/min durante 20 min, usando-se na mesma coluna e condições descritas acima. O único pico obtido após a Segunda 10 cromatografia no HPLC (PII-4R2) foi coletado e submetido a um SDS-PAGE. Uma aliquota do Lopap purificado foi dialisado contra EDTA 10 mM para ser utilizado nos experimentos descritos na figura 4.

A homogeneidade da proteína foi analisada 15 por SDS-PAGE¹ usando gel de poliacrilamida 10% (p/v) corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. As concentrações protéicas foram determinadas de acordo com método descrito previamente e por absorbância em 280 nm. A capacidade ativadora do 20 Lopap (300 nM) foi testada na presença de diferentes concentrações de acetonitrila e após a liofilização.

Exemplo 3:

DETERMINAÇÃO PARCIAL DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS
25 DO ATIVADOR DE PROTROMBINA :

Submeter 500 - 1000 pM do purificado à degradação por 10 pmol de tripsina em 100mM Tris-HCl, pH 8.0 contendo 0.02.% de CaCl₂ durante 18

horas a 37°C finalizando a reação com 15% (v/v) de ácido fórmico.

Separar os fragmentos obtidos em HPLC utilizando-se uma coluna C₄, solventes de eluição a base de 0,1% de TFA em água (solvente A) e acetonitrila: solvente A (9:1) com solvente B.

Para a separação no HPLC utilizou-se um gradiente de 0-100% de solvente B com fluxo de 1.0 ml/min durante 30min.

10

Exemplo 4:

DETERMINAÇÃO PARCIAL DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS

DO Lopap:

O Lopap purificado (500pM) foi submetido a degradação por tripsina (10 pmol) em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 contendo CaCl₂ 0,02% durante 18 h a 37°C. A reação foi interrompida usando-se ácido fórmico 15% (v/v). Os fragmentos obtidos foram separados em HPLC usando uma coluna C₄, e os solventes de eluição foram TFA 0,1% em H₂O (solvente A), e acetonitrila: solvente A (9:1) com solvente B.

Para a separação no HPLC foi utilizado um gradiente de 0-100% de solvente B, com fluxo de 1,0 ml/min, durante 30 min. A seqüência de três peptídeos internos e do N-terminal foi determinada usando-se o equipamento da Applied BioSystem que realiza as reações da degradação de Edman (17). A busca para verificar homologia da estrutura

primária do Lopap com outras proteínas foi realizada usando-se o banco de dados Swiss Protein Data Base.

Exemplo 5:

5 ATIVIDADE ATIVADORA DE PROTROMBINA:

A capacidade do Lopap ativar a protrombina foi indiretamente determinada através do ensaio de formação de trombina a partir da protrombina usando o substrato cromogênico S-2238. A atividade 10 ativadora da protrombina do extrato das cerdas, das frações parcialmente purificadas e do Lopap purificado (15 a 300nM) foi avaliada após pré-incubação durante 10 min a 37°C com protrombina 15 (90 pM), na presença de 5 mM de CaCl₂ para volume final de 500μl. Esta reação ocorreu em Tris-HCl 50mM, NaCl 100mM, pH 8,3, contendo imidazol 150mM. A hidrólise de S-2238 40μM pela trombina formada a partir do Lopap usando 90nM do fator II e 90nM de trombina purificada foi acompanhada 20 espectrofotometricamente a 405 nm durante 10 min a 37°C.

Exemplo 6:

ATIVIDADE ATIVADORA DO FATOR X:

Fator X (30nM) foi pré-incubado com Lopap 25 75nM durante 20 min a 37°C em 120μl de tampão Tris-Hcl 25mM pH 8,3 contendo NaCl 200mM e CaCl₂ 10 mM. A seguir 150 μl de tampão Tris-Hcl 50mM pH 8,3

contendo imidazol 150 mM, NaCl 100mM e 165 μ l de tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0 contendo Hepes 10mM, NaCl 500 mM e PEG 6000 0,1% foram adicionados até o volume final de 500 μ l. A formação do fator Xa 5 foi acompanhada através da absorbância em 405 nm durante 10 min a 37 °C após a adição de 150 μ M do substrato S-2765. A hidrólise de 150 μ M do substrato S-2765 por 30 nM do Fator Xa purificado 10 foi acompanhado usando as condições experimentais descritas.

Exemplo 7:

ATIVIDADE DO LOPAP SOBRE O FIBRINOGÊNIO PURIFICADO

Lopap (2 μ M) foi incubado na presença e na ausência de fator II (90nM) em tampão Tris-HCl 15 50mM, contendo CaCl₂ 5mM e NaCl 100mM, num volume final de 300 μ l durante 10 min a 37 °C . Em seguida, fibrinogênio humano purificado (7,5 μ M 0 (Chromogenix) foi adicionado e a transformação da protrombina em trombina foi avaliada através do 20 tempo de coagulação.

Exemplo 8:

ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA COM SUBSTRATO
FLUOROGENICO E DETERMINAÇÃO DOS SÍTIOS DE
CLIVAGEM:

25 O ensaio foi realizado usando-se o substrato de fluorescência apagada Abz-

YQTFFNPRTFGSQ-EDDnp no espectrofluorímetro da marca Hitachi F-2000 nos comprimentos de onda de 320nm (excitação) e 420 nm (emissão). Antes da adição DE 10 μ l da solução estoque do substrato (preparado em DMF:H₂O, 1:1 v/v), a enzima (73,3pM) foi incubada em uma cubeta termoestável com 1,5ml de tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,0 a 37°C. A partir dos dados da velocidade que foram registradas continuamente por 10 min foram determinadas as constantes cinéticas Km e Kcat. As constantes cinéticas e seus respectivos erros foram obtidos através da equação de Michaelis-Menten usando-se o método descrito por Wilkinson. Para a determinação do sitio de clivagem, os fragmentos peptídicos foram separados através de cromatografia de fase reversa em HPLC usando-se uma coluna C₁₈. Os solventes de eluição são TFA 0,1% em H₂O (solvente A), e acetonitrila-solvente A (9:1) como solvente B. O gradiente usado para a separação foi de 10-100% do solvente B, com fluxo de 1ml/min. Os sitios de clivagem foram determinados usando fragmentos internos de peptídeos sintéticos usados como padrão.

Exemplo 9:

25

INIBIÇÃO DE LOPAP

O ensaio para a verificação da enzimática do Lopap foi realizada através de substratos cromogênicos , neste experimento foram utilizados os inibidores PMSF (10Mm) ou E-64 (3.2mM) com

Lopap (75nM) num volume final de 500 μ l. Os inibidores foram pré-incubados com Lopap durante 15 min a 37°C antes da adição do substrato S-2238 (40 μ M).

5 Exemplo 10:

INFLUÊNCIA DE ÍONS BIVALENTES NA ATIVIDADE DO
LOPAP:

O Lopap foi exaustivamente dialisado contra EDTA 100mM durante 48 h a 4 °C Lopap (75 nM) 10 dialisado ou não tratado foi incubado na presença na ausência de CaCl₂ (5 mM), MgCl₂ (5mM), ou ZnCl₂(5 mM), a 37 °C durante 10 min com Fator II (90mM), na presença de 40 μ M do substrato S-2238, com tampão Tris-HCl 50mM, contendo NaCl 100mM, pH 15 8,3, num volume final de 500 μ l. A hidrólise do substrato foi monitorado espectrofotometricamente a 405 nm durante 20 min em um equipamento Beckman DU-7.

Exemplo 11:

20 TITULAÇÃO DA ATIVIDADE DA SERINO PROTEASE LOPAP
POR NPGB:

O ensaio cromogênico para a titulação do sítio ativo Lopap foi realizada com o reagente NPGB, seguindo protocolo descrito previamente. A 25 concentração do Lopap ativo foi determinada através da titulação com p-nitrofenil-p'-guanidinobenzoato 0,47 μ M (NPGB) em tampão barbital

sódico 0,1M, pH 8,3 a 37 °C, num volume final de 1,0 ml. O p-nitrofenol liberado foi quantificado em absorbância a 410nm em um espectrofotômetro Hitachi U-2000.

5 Exemplo 12:

DETERMINAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE PROTROMBINA POR

LOPAP:

Lopap (30nM) foi incubado com protrombina (500nM) durante 0, 1, 3, 6, 8 e 24 h a 37 °C em 10 500µl de tampão Tris-HCl 50 mM, contendo CaCl₂ (5mM) e NaCl 100mM, pH 8,0. Os resultados da hidrólise foram analisados por SDS-PAGE (gel 10%) sob condições redutoras e não redutoras e corado pelo método de coomassie Brilliant Blue R-250.

15 Exemplo 13:

PURIFICAÇÃO DO ATIVADOR DE PROTROMBINA (LOPAP):

O processo de purificação do Lopap incluiu uma cromatografia de gel filtragem e duas cromatografias de fase reversa. O perfil protéico 20 obtido na cromatografia de gel filtração está representado na figura 1 A. Somente a filtração denominada PII apresentou a capacidade de ativar a protrombina, o qual foi submetido a cromatografia de fase reversa, que resultou em vários picos que 25 estão representados na figura 1B. A capacidade de ativação da protrombina foi detectada no pico eluído com 43% de acetonitrila (fig. 1B). Esta

fração que continha a atividade foi submetida a uma segunda cromatografia de fase reversa resultando em dois picos, sendo que apenas um deles apresentou a capacidade de ativar a 5 protrombina (Fig. 1C). A fração de interesse foi novamente submetida a uma cromatografia de fase reversa usando as mesmas condições, com o objetivo de confirmar a presença de um único pico (Fig. 1D). Esta purificação resultou em uma proteína com cerca de 50% da atividade, como está mostrado na 10 tabela 1. A homogeneidade da preparação da proteína está representada na Fig. 1D. O material purificado apresentou uma banda única de aproximadamente 69 KDa no SDS-PAGE.

15 Exemplo 14:

DETERMINAÇÃO DA SEQÜÊNCIA N-TERMINAL E DE
FRAGMENTOS INTERNOS DO LOPAP:

A porção N-terminal com 46 resíduos de aminoácidos

20 (DVVIDGACPDMKAVSKFDMNAYQGTWYEIKKFPVANEANGDCGSVE) foi obtida a partir do Lopap purificado, assim como a seqüência de alguns fragmentos de peptídeos internos denominados Fragmento I: KSHVYTVPFGA. Fragmento II: KSNQHRVNIWILSRTK. Fragmento III: 25 VRAGHVE e Fragmento IV: FDQSKFVETDFSEKACFF. A seqüência obtida correspondeu a cerca de 15% da

proteína completa assumindo-se a massa molecular de 69 kDa.

Exemplo 15:

CAPACIDADE DE ATIVAÇÃO DE PROTROMBINA:

5 A trombina gerada a partir do Lopap ocorreu de forma dose dependente (Fig. 2). Protrombina (90nM) foi incubada com 75 nM de Lopap gerando a mesma quantidade de trombina, que foi capaz de hidrolisar o substrato S-2238 (40mM),
10 assim como a hidrólise induzida por 90 nM de trombina purificada. A atividade da trombina foi detectada a partir de 1 min de pré-incubação.

Exemplo 16:

ATIVIDADE ATIVADORA DE FATOR X:

15 O Lopap não apresentou capacidade de ativar o fator X e, além disso, não foi capaz de hidrolisar o substrato cromogênico S-2765. A hidrólise obtida com 75 nM de Lopap incubado durante 10 min a 37 °C do substrato S-2765 150. μ M
20 foi de 0,34 μ M. A concentração de p-nitroanilida formada durante a reação foi calculada usando-se o valor $8900 M^{-1} cm^{-1}$ para o coeficiente de extinção molar a 405 nm. Quando Fator X (30nM) foi adicionado ao ensaio, a hidrólise do substrato
25 obtida foi de 2,6 μ M. Na ausência de Lopap a

absorbância do Fator Xa (30nM) purificado foi 34 μM .

Exemplo 17:

COAGULAÇÃO DO FIBRINOGÊNIO POR LOPAP:

5 O Lopap não apresentou atividade do tipo trombina sobre o fibrinogênio purificado, assim como poderia ser deduzido a partir do prolongamento do tempo de coagulação (tabela 2).
 10 No entanto, na presença de protrombina, a formação de um coágulo sólido foi observada após 240s, e a adição de Ca^{2+} reduziu o tempo de coagulação para 60s.

Exemplo 18:

ATIVIDADE HIDROLÍTICA DO LOPAP SOBRE O PEPTÍDEO

15 **FLUOROGÊNICO:**

Os parâmetros cinéticos determinados para o Lopap usando o substrato de fluorescência apagada Abz-QTFFNPRTFGSQ-EDDnp, baseado na seqüência da protrombina foram K_{mapp} 4,5 μM ; K_{cat} 5,32 sec^{-1} ; K_{cat}/K_{mapp} $1,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, indicando uma boa afinidade e uma alta eficiência catalítica para a enzima estudada, sendo que estes parâmetros foram obtidos de acordo com Chagas et al. A seqüência de aminoácidos originada a partir dos fragmentos internos do Lopap mostrou atividade sobre o substrato Abz-YQTFFNPRTFGSQ-EDDnp o qual

foi hidrolisado em dois sítios Phe-Phe (10%) e Arg-Thr (90%) (Fig. 3)

Exemplo 19:

5

INIBIÇÃO E INTERFERÊNCIA ÍONS BIVALENTES NA ATIVIDADE DE LOPAP:

A atividade do Lopap foi drasticamente diminuída após a diálise contra EDTA, e pode ser substancialmente recuperada através da adição de 10 Ca^{2+} (Fig.4). Além disso, a atividade do Lopap foi completamente abolida por PMSF 10 mM, enquanto não afetada por E-64 3,2 mM. A titulação dos resíduos putativos de serina encontrados no Lopap usando-se o NPGB indicou a estequiometria de 1,2 resíduos de serina por molécula de NPGB.

Como pode ser visualizado na Fig.4, Lopap ativa diretamente a protrombina e mostrou um aumento desta atividade após a adição de íons Ca^{2+} . Após ter sido submetido a exaustiva diálise contra 20 EDTA, a atividade do Lopap diminuiu cerca de 75%, e pode ser gradativamente recuperada através da adição de concentrações crescentes de íons Ca^{2+} . Outros íons bivalentes, tais como Mg^{2+} e Zn^{2+} não produziram o mesmo efeito.

25

Exemplo 20:

DETERMINAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE PROTROMBINA POR LOPAP:

Sob condições não redutoras a hidrólise da protrombina (72 kDa) por Lopap resultou em vários fragmentos (massas moleculares de 52 kDa, 36 kDa, 27 kDa e 16 kDa representando o peptídeo F1/F2, 5 pretrombina 2 ou α -trombina, Fragmento-1 (F1) e Fragmento-2 (F2) respectivamente. Sob condições redutoras, a ativação de protrombina resultou em fragmentos de massas moleculares 52 kDa, 36 kDa, 32 kDa, 27 kDa e 16 kDa, representando F1/F2-activation peptide, pretrombina 2, trombina B-chain, Fragmento-1 (F1) e Fragmento-2 (F2), respectivamente (fig.5)

Exemplo 21:

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ATIVADORA DE PROTROMBINA

DA FRAÇÃO II:

Pré-incubar 15 a 300nM da fração purificada durante 10 minutos a 37° C com 90 pM de protrombina na presença de 5mM de CaCl₂ para volume final de 500 μ L na presença de 50mM de Tris-HCl, 100mM de NaCl, pH 8 e 3 e 150 mM de imidazol, a adição de 40 μ M do substrato cromogênico S-2238 (H-D-phenylalanyl-L-pipicollyl-L-arginine-p-nitroanilide dihydrochloride), à mistura de incubação e acompanhar espectrofotometricamente a 25 405 nm durante 10 min. a hidrólise do substrato cromogênico.

Exemplo 22:

TESTE DA ATIVIDADE DO LAPAP NO PLASMA HUMANONORMAL:

A fim de testar a atividade procoagulante do Lopap, extrato bruto de cerdas (10 a 30 µg) ou 5 a enzima purificada (1 a 16 µg) foram incubadas a 37 °C com 100µg de plasma humano normal na presença de 6,25 mM de CaCl₂; num volume final de 400µg. A atividade pró-coagulante foi avaliada pela redução do tempo de recalcificação do plasma comparado ao 10 tempo de coagulação do plasma na ausência de Lopap ou extrato bruto (controle).

Exemplo 23:

OS EFEITOS DE LOPAP NA REDE MICROCIRCULATÓRIA

Estudos microscópicos intravitais:

15 Os efeitos de Lopap na rede microcirculatória foram determinados *in situ* na fáscia espermática interna em ratos anestesiados (250g) com pentobarbital sódico, 50 mg/kg, via intraperitoneal. A técnica cirúrgica empregada 20 para este procedimento foi descrita

Resumidamente, os animais foram mantidos numa mesa especial termostaticamente controlada a 37°C incluindo uma plataforma transparente na qual o tecido foi colocado para ser transiluminado. A 25 preparação foi mantida úmida e quente pela irrigação do tecido com solução aquecida de

Ringer-Locke, 154mM de NaCl, 5,6mM de KCl, 2mM de CaCl₂, 6 mM de NaHCO₃, e 6 mM de glicose, pH 7,2 - 7,4, contendo 1% de gelatina. Através de uma câmera de vídeo colorida incorporada a um microscópio triocular (Axioskope, Carl Zeiss), as imagens da microcirculação foram simultaneamente visualizadas nos monitores da TV e do computador. As imagens obtidas no monitor da TV foram gravadas em vídeo e as imagens digitalizadas no computador foram analisadas usando software (KS300, Kontron). As imagens foram obtidas usando uma distância longitudinal de abertura no diafragma/numérica objetiva de x10/025x1.6 otovar. Lopap (100µg/kg) foi injetado i.v. (veia caudal) e a dinâmica da microcirculação dos vasos foram observadas nos monitores. Animais controle receberam volumes equivalentes de salina estéril. Uma hora após a injeção e a observação da microcirculação, o sangue foi coletado da aorta abdominal (500µg), e o tempo de coagulação do sangue total foi medido.

Exemplo 24:

Estudo in vivo:

Lopap (100µg/kg), foi injetado através da veia caudal em ratos machos do tipo Wistar pesando 200-250g. Ratos controle receberam 150mM de NaCl sob as mesmas condições. Após uma hora, eles foram anestesiados e o sangue foi coletado pela aorta abdominal em seringas plásticas. Sangue para contagem de células foi anticoagulado com 2,7mM de

Na₂-EDTA, e para agregação plaquetária do sangue total com 139mM de citrato trisódico (1 parte para 9 partes de sangue total) foi adicionado. Plasma pobre em plaquetas foi obtido pela centrifugação do sangue com citrato a 1900g por 15 min. a 4° C. A agregação plaquetária do sangue total foi realizada como descrito em Sano-Martins IS, Santoro ML, Castro SCB, Fan HW, Cardoso JLC, theakson RDG. *Platelet aggregation in patients bitten by the brazilian snake Bothrops jararaca*. Thromb. Res. 1997; 87 (2): 183-95. Colágeno (5 µg /ml de concentração final) (Hormon-Chemie, Alemanha) foi usado como um agonista para induzir a agregação das plaquetas. As contagens das células do sangue foram realizadas num sistema Serono-Baker 9020+AX, e o fibrinogênio foi mantido de acordo com von Clauss (*gerinnungsphysiologische schnellmethode zur bestimmung des fibrinogens. Acta Haematol 1957, 17: 237-46*) com reagentes e controles da Diagnóstica Stago.

Exemplo 25:

HISTOPATOLOGIA:

Os mesmos animais empregados nos estudos in vivo foram usados para análises histopatológicas. Fragmentos de cérebro, pulmões, fígado e rins foram coletados e colocados por 48 horas numa solução a 10% de formalina. Eles foram,

então embebidos em parafina e processados para análises histológicas de rotina e analisadas após a coloração com eosina.

Exemplo 26:

5

ANÁLISES ESTATÍSTICAS:

Com a finalidade de comparar a contagem de plaquetas e agregação plaquetária do sangue total entre ratos injetados com Lopap e ratos controle, estudo do teste-t foi empregado, usando o software 10 de estatística Stata™ 5.0.

Resultados:

a) Atividade do Lopap sobre o plasma:

O extrato bruto da cerda foi incubado com plasma humano normal citratado e o tempo de coagulação obtido foi entre 290-80 s (tabela 1), enquanto Lopap (1-16 μ g) coagulou o plasma humano normal citratado num intervalo de tempo similar (tabela 1)

b) Testes biológicos com Lopap:

20 1. Estudos microscópicos intravirais:

A administração intravenosa de proteína provocou proeminentes alterações na rede microcirculatória do músculo cremaster. A formação 25 de trombos foi observada em pequenos vasos (10 -

30 μ m de diâmetro), principalmente em vênulas 5 min após a injeção. Este efeito foi mais pronunciado após 40 min, quando o envenenamento sistêmico com total parada venular e trombos nas arteríolas foram claramente visualizadas (fig. 6). Áreas hemorrágicas foram visualizadas após 30 min. da administração de Lopap. Uma hora após a injeção, o sangue obtido dos animais tratados com Lopap estava incoagulável. Animais controle que receberam solução salina não apresentaram alterações microcirculatórias.

2. Parâmetros coagulantes "in vivo":

A contagem de plaquetas decresceu uniformemente nos ratos injetados com Lopap, cerca de 40% em comparação aos ratos controle, bem como a agregação plaquetária induzida por colágeno foi abolida. Nenhuma alteração morfológica ou quantitativa tanto de eritrócitos ou de células da linhagem de leucócitos foram observadas. Nenhum fibrinogênio foi detectado nestes animais.

3. Histopatologia:

Uma hora após a inoculação de Lopap, uma pronunciada infiltração de leucócitos foi observada nos pulmões dos animais experimentais (Fig. 7B e C). Neutrófilos e monócitos aderiram as células endoteliais de pequenos vasos sanguíneos. Estas células também foram detectadas nos espaços parenquemais do órgão (fig. 7C). Uma marcante congestão vascular foi observada nos vasos

glomerulares e em vasos entre os túbulos renais proximais e distais (fig, 8b) A hemorragia não foi observada somente nos vasos glomerulares, mas também em outros vasos do órgão. Na região medular, células tubulares apresentaram áreas focais de necrose hialina. Alterações histológicas não foram observadas quando outros órgãos foram analisados.

Acidentes devido ao contato com as cerdas da taturana *Lonomia obliqua* causam a incoagulabilidade do sangue em seres humanos e alterações nos fatores de coagulação que estão relacionados com a trombina e podendo levar a síndrome hemorrágica. Proteínas procoagulantes tais como fator X e ativadores de protrombina de venenos de animais são responsáveis pela coagulopatia de consumo através da depleção de fibrinogênio. Embora a via de ativação de protrombina mais importante ser através do complexo protrombinase, a protrombina também pode ser ativada por fatores exógenos, tais como componentes do veneno de serpentes através de vias distintas.

Após comparar os produtos de hidrólise da protrombina gerada a partir do Lopap (tabela 3) com os fragmentos gerados por outros ativadores de protrombina, um mecanismo de ação pode ser sugerido envolvendo a formação de pretrombina 2 e trombina.

Como aparentemente a meizotrombina não é formada por Lopap e produtos com massa moleculares similares a pretrombina 2 são gerados, Lopap poderia ser classificado como um ativador do Tipo 5 4. No entanto, os ativadores do Tipo 4 não são capazes de converter protrombina em produtos enzimaticamente ativos enquanto Lopap é capaz de gerar trombina ativa. Por outro lado, as massas moleculares dos fragmentos formados são similares 10 àqueles formados por fator Xa na presença do complexo protrombinase. Além disso, os resultados obtidos a partir da hidrólise do substrato de fluorescência apagada, demonstram que a clivagem na cadeia principal ocorre na mesma ligação 15 clivada pela trombina (Arg-Thr).

A auto-catálise é um dos maiores problemas detectados no ensaio de hidrólise envolvendo a protrombina, e o verdadeiro mecanismo de ação do Lopap sobre a protrombina somente será elucidado e 20 confirmado quando um recombinante de protrombina poderá ser empregado, e a análise da espectrometria da massa e a seqüência de aminoácidos dos fragmentos forem realizadas.

A partir do extrato das cerdas da *L. obliqua* os inventores da presente invenção purificaram uma serino protease ativadora de protrombina de 69 kDa. Os resultados preliminares mostraram que a capacidade ativadora do Lopap é independente do complexo protrombinase, no entanto

ions Ca^{2+} promoveram um aumento desta atividade. O processo de purificação do Lopap incluiu o uso de solventes orgânicos, os quais causaram uma visível perda da atividade, atingindo cerca de 50% na presença de 30% de acetonitrila e 80% na presença de 50% acetonitrila (tabela 1), dessa forma é muito difícil calcular a atividade específica da proteína. Métodos menos drásticos de purificação não foram tão eficientes, e no momento a produção de Lopap recombinante está sendo realizada.

Lopap foi caracterizado como sendo uma serino protease ativada por íons Ca^{2+} , e é estruturalmente distinta de outros ativadores de protrombina descritos até o presente momento. O fragmento N-terminal apresentaram 45,6% de identidade com a porção N-terminal da insecticianina purificada da hemolinfa de *Manduca Sexta*, enquanto os fragmentos I, II, e III apresentaram respectivamente 36,4%, 37,5%, 42,9% e 55,5% de identidade com a seqüência dos fragmentos internos da mesma proteína ($\text{G}_{86}-\text{Q}_{97}; \text{D}_{124}-\text{E}_{148}; \text{I}_{160}-\text{Y}_{177}$).

A homogeneidade do Lopap purificado foi confirmada através de um único resíduo N-terminal. O substrato de fluorescência apagada foi desenhado de forma a conter a ligação $\text{Arg}_{284}-\text{Thr}_{285}$ da trombina, flanqueada pela seqüência $\text{Tyr}_{277}-\text{Ser}_{288}$. Este substrato foi clivado pelo Lopap na ligação

peptídica correspondente à ligação da protrombina clivada tanto pelo Lopap como pela trombina.

De acordo com a presente invenção foi demonstrado que o Lopap não é capaz de ativar o fator X, tendo o ativador de Fator X purificado (resultados preliminares) do extrato bruto das cerdas de *L. obliqua*, de forma distinta do Lopap. Há ao menos dois componentes procoagulantes no veneno deste animal (tabela 3).

De acordo com a presente invenção o Lopap é um novo ativador de protrombina, o que é um importante fator responsável pela coagulopatia de consumo, encontrado em pacientes envenenados por *L. obliqua*.

Em doses baixas a proteína purificada, pela sua capacidade de ativar protrombina gerando trombina, retira da circulação de forma controlada o fibrinogênio, transformando-o em microcoágulos de fibrina. Esta diminuição da concentração plasmática de fibrinogênio permite que o tempo de coagulação do sangue se prolongue e, portanto, impede a trombose vascular aguda.

Pelo fato de não possuir atividade proteolítica a proteína manteria a capacidade coagulante do fibrinogênio não consumido no processo. Desta forma a concentração plasmática de fibrinogênio seria diminuída, porém, não haveria predisposição para um estado hemorrágico. Além

disso, poderia ser utilizada na confecção de KITS diagnósticos para detecção de protrombina plasmática.

Tabela 1:

5 Influência da acetonitrila na atividade do Lopap (300nM) testada na presença de diferentes concentrações de acetonitrila. Sua atividade foi determinada indiretamente através do ensaio da formação de trombina a partir da protrombina
10 utilizando o substrato cromogênico S-2238.

Acetonitrila (%)	Lopap	F II	S-2238	Hidrólise (%)
0	+	-	+	0
0	-	+	+	0
0	+	+	+	100
30	+	+	+	50,7
50	+	+	+	21,7
90	+	+	+	1,8

Tabela 2:

Coagulação do fibrinogênio por Lopap.

Lopap ($2\mu M$) foi incubada durante 10 min. a $37^\circ C$ na presença e na ausência de Fator II (90nM), em
15 tampão Tris-HCl 50mM contendo $CaCl_2$ 5nM e $NaCl$

100mM em um volume final de 300 μ l. Fibrinogênio humano purificado (7,5 μ M) foi adicionado e a transformação de protrombina em trombina foi avaliada através do tempo de coagulação da fibrina
 5 FG= fibrinogênio.

Lopap	FXa	F II	Ca ²⁺	FG	Tempo de coagulação (s)
-	+	+	+	+	120
-	-	+	-	+	> 1200
-	-	+	+	+	> 1200
+	-	-	-	+	> 1200
+	-	+	+	+	60
+	-	+	-	+	240

Tabela 3:

Comparação dos fragmentos de protrobina obtidos após a hidrólise com diferentes ativadores, analisada por SDS-PAGE. A: condições redutoras; B: condições não redutoras.
 10

Fragmento	Massa Molecular (kD)	Ecarina		Ativador de <i>O. scutellatus</i>		Lopap	
		A	B	A	B	A	B
Protrombina	72	+	+	+	+	+	+
Meizotrombina	72	-	+	-	+	-	-
F1/F2/ cadeia A	55	+	+	+	-	-	-
F1/F2	52	+	+	-	+	+	+
α -trombina	36	-	+	+	+	-	+
Pretrombina 2	36	-	-	+	+	+	+
Frag. B da trombina	32	+	-	+	-	+	-
Fragmento 1	27	+	+	+	+	+	+
Fragmento 2	16	+	+	+	+	+	+

Figura 1:

PURIFICAÇÃO DO ATIVADOR DE PROTROMBINA LOPAP
ENCONTRADO NO EXTRATO DAS CERDAS DA TATURANA
LONOMIA OBLIQUA .

A) Cromatografia de gel filtração em Sephadex G-75.

A capacidade de ativação da protrombina foi detectada usando-se substrato cromogênico S-2238.

5 B) Cromatografia de fase reversa (sistema de HPLC, coluna C4) da fração PH da etapa da gel filtração, eluído com um gradiente linear de 35-

50% do solvente B.

C) Segunda chromatografia de fase reversa, como

10 descrita previamente, exceto que neste caso o gradiente utilizado foi de 20-80% do solvente B.

D) Cromatografia de fase reversa do pico PII-4R2

como descrita previamente. Detalhe: SDS_PAGE de 20 μ g da proteína purificada (Poço 1), e padrão

15 de massa molecular (Poço 2): fosforipase B, 94kDa; albumina, 67kDa, ovalbumina, 43kDa;

anidrase carbônica, 30kDa; inibidor de tripsina, 21 kDa; α -lactoalbumina, 14.4kDa.

Figura 2:

20 Lopap (15-300nM) foi pré-incubada durante 10 min a 37°C com protrombina 90nM e incubada a 37°C com o substrato cromogênico S-2238 (40 μ M) na presença de CaCl₂ 5mM no volume final de 500 μ l.

○ 15nM; ▲ 30nM; □ 75nM; ■ 150nM; ▨ 300nM.

25 Figura 3:

HIDRÓLISE DO SUBSTRATO FLUOROGÊNICO POR LOPAP:

A) Abz-YQTFNPRTFGSQ-EDDnp foi incubado com Lopap em tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,0 a 37°C por 3 h. A incubação foi analisada através de cromatografia em HCl como descrito em Materiais e Método.

B) O perfil para a determinação da constante de Michaelis-Menten obtida com o substrato fluorescente substrato (0,8 - 8,0 μ M) hidrolisado por Lopap (73,3 pM).

10 Figura 4:

INFLUÊNCIA DE ÍONS BIVALENTES NA CAPACIDADE DE
LOPAP ATIVAR A PROTROMBINA.

Lopap dialisado ou não tratado (75nM) foi incubado a 37°C com 40 μ M de substrato cromogênico S-2238 e protrombina 90nM; • Controle: ausência de protrombina; □ reação com Lopap não tratado na presença de CaCl₂ 5mM; ■ reação com Lopap não tratado na ausência de Ca²⁺; ▲ Lopap dialisado contra EDTA 100mM; □ reação usando Lopap dialisado na presença de CaCl₂ 5 mM; * reação usando Lopap dialisado na presença de MgCl₂ 5mM mM; ○ reação usando Lopap dialisado na presença de ZnCl₂ 5mM.

Figura 5:

25 HIDRÓLISE DE PROTROMBINA POR LOPAP SDS-PAGE:

Hidrólise de protrombina por lopap SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 10%) incubações de protrombina humana (500nM) com Lopap (30nM) durante 0.1.3.6.8 e 24 h em condições redutoras. Controles: FII (protrombina humana) e Fator IIa (trombina humana, 12 U).

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS DAS CERDAS DA L. OBLIQUA COM ATIVIDADE ATIVADORA DE PROTROMBINA caracterizado pelo fato de conter as seguintes etapas:

- a) Homogeneizar cerdas de L. obliqua em Tampão salina fosfato (PBS), pH 7.4-8.0, centrifugar a 2500g 4° a 10° C durante 30 a 60 minutos obtendo-se um extrato bruto a base do ativador de protrombina ;
- b) Purificar o ativador de protrombina a partir de 50 a 200 mg de proteína total em 2 a 10 ml de extrato bruto por cromatografia de gel filtração em resina Sephadex G-75, eluída em tampão de Tris-HCL 20 a 50 mM contendo NaCL 50 a 100 mM e benzamidina 2 a 5 mM, pH 7.4 a 8.0 com fluxo 1,0 ml/h;
- c) Coletar frações de 1 a 3 ml e monitorar o perfil protéico da cromatografia por absorbância UV em 280 nm;
- d) Ativar a protrombina com o material obtido nos picos protéicos usando o substrato colorimétrico S-2238 específico para trombina;
- e) Obter o pico PII que deve conter a ação ativadora de protrombina;
- f) Submeter o obtido ativo à cromatografia de fase reversa através da coluna C4 no sistema analítico de HPLC empregando como solventes: - A: 0,1% TFA em água (equilíbrio) e B: 10% solvente A e acetonitrila na proporção 1:9

(eluição) e proceder à detecção protéica a 214 ou 280 nm em monitor de UV;

5 g) Coletar frações de 0.5 - 1.0 ml e liofilizar imediatamente para eliminar a acetonitrila;

10 h) Ressuspender as amostras liofilizadas em tampão Tris-HCL 20 a 50 mM contendo NaCL 50 a 100 mM pH 7.4 a 8.0;

i) Testar atividade ativadora de protrombina das frações conforme descrito no item d);

j) O pico ativo está nas frações eluídas entre 42 a 44% de solvente B;

15 k) Recromatografar a fração ativa conforme descrito no item (f) utilizando gradiente entre 20 - 80% de solvente B, durante 20 minutos;

l) Repetir etapas de (f) a (j);

20 m) Submeter material purificado a uma eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS para avaliação da pureza. O gel pode ser corado por Coomassie brilhante blue;

n) Avaliar a concentração de proteína final por dosagem de proteína por métodos colorimétricos ou por Absorbância em 280 nm visando obter o ativador de protrombina;

- 25 2. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de se empregar na etapa (b) os seguintes solventes para eluição: solvente A: 0,1% TFA em água e solvente B: 10% solvente A e acetonitrila na proporção 1:9;

3. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato do sistema analítico de HPLC empregado na etapa (f) ser da Merck-Hitachi (modelo D-2500 0 e o monitor da etapa (g) ser da Shimadzu UV (modelo SPD-6AV);
4. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de se realizar a purificação no HPLC da etapa (f) utilizando-se um gradiente de 35-50% de solvente B;
5. PROCESSO PARA DETERMINAÇÃO PARCIAL DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ATIVADOR DE PROTROMBINA caracterizado pelo fato de que 500 - 1000 pM do purificado é submetido à degradação por 10 pmol de tripsina em 100mM Tris-HCl, pH 8.0 contendo 0.02.% de CaCl₂ durante 18 horas a 37°C finalizando a reação com 15 % (v /v) de ácido fórmico;
6. PROCESSO de acordo com a reivindicação 5 caracterizado pelo fato de que os fragmentos obtidos serem separados em HPLC utilizando-se uma coluna C4, solventes de eluição a base de 0,1% de TFA em água (solvente A) e acetonitrila: solvente A (9:1) como solvente B;
7. PROCESSO de acordo com a reivindicação 6 caracterizado pelo fato de que para a separação no HPLC é utilizado um gradiente de

0-100% de solvente B com fluxo de 1.0 ml/min durante 30min;

8. PROCESSO de acordo com a reivindicação 7 caracterizado pelo fato de se determinar a seqüência de quatro peptídeos internos e do N-terminal;

5 9. PROCESSO de acordo com a reivindicação 8 caracterizado pelo fato de que a porção N-terminal contém 46 resíduos
10 (DVVIDGACPDMKAVSKFDMNAYQGTWYEIKKFPVANEANGDCGSV
E) de aminoácidos e os fragmentos de peptídeos internos são: Fragmento I (KSHVYTVPPGA); Fragmento II (KSNQHRVNIWILSRTK); Fragmento III (VRAGHVE) e Fragmento IV (FDQSKFVETDFSEKACFF);

15 10. PROCESSO de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a seqüência obtida corresponde a cerca de 15% da proteína completa e massa molecular de 69KDa;

20 11. PROCESSO DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ATIVADORA DE PROTROMBINA DA FRAÇÃO II caracterizada pelo fato de conter as seguintes etapas:

25 a) Pré-incubar 15 a 300nM da fração purificada durante 10 minutos a 37° C com 90 pM de protrombina na presença de 5mM de CaCl₂ para volume final de 500µL na presença de 50mM de Tris-HCl, 100mM de NaCl, pH 8 e 3 e 150 mM de imidazol;

- b) Adicionar 40 µM do substrato cromogênico S-2238 (H-D-phenylalanyl-L-picolyl-L-arginine-p-nitroanilide dihydrochloride), à mistura de incubação e acompanhar espectrofotometricamente a 405 nm durante 10 min. a hidrólise do substrato cromogênico;
- 5
12. SEQUÊNCIA N-TERMINAL E SEQUÊNCIA DE FRAGMENTOS INTERNOS DA FRAÇÃO ATIVADORA DE PROTROMBINA caracterizada por conter a porção N-terminal com 46 resíduos (DVVIDGACPDMKAVSKFDMNA-YQGTWYEIKKFPVANEANGDCGSVE) de aminoácidos e os fragmentos de peptídeos internos são: - Fragmento I (KSHVYTVPGFA); Fragmento II (KSNQHRVNIWILSRK) Fragmento III (VRAGHVE) e Fragmento IV (FDQSKFVETDFSEKACFF) sendo que a seqüência obtida corresponde à cerca de 15% da proteína completa e massa molecular de 69 KDa;
- 10
- 15
13. ATIVADOR DE PROTROMBINA obtido de acordo com o processo das reivindicações de 1 a 11, caracterizado pelo fato de conter a seguinte estrutura: A proteína purificada é caracterizada como uma serino-protease que hidrolisa a protrombina gerando Fragmentos 1, 2 e trombina de acordo com as figuras;
- 20
- 25 14. USO DO ATIVADOR da reivindicação 13, caracterizado pelo fato de poder ser utilizado como um desfibrilante em estados pró-trombóticos;

15. USO DO ATIVADOR da reivindicação 13,
caracterizado pelo fato de poder ser utilizado
para a fabricação de kit para diagnóstico de
protrombina em plasma de pacientes com
problemas hemorrágicos;

RESUMO

"PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS DAS CERDAS DA *L. OBLIQUA* COM ATIVIDADE ATIVADORA DE PROTROMBINA; PROCESSO PARA DETERMINAÇÃO PARCIAL DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ATIVADOR DE PROTROMBINA; PROCESSO DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ATIVADORA DE PROTROMBINA DA FRAÇÃO II, SEQÜÊNCIA N-TERMINAL E SEQÜÊNCIA DE FRAGMENTOS INTERNOS DA FRAÇÃO ATIVADORA DE PROTROMBINA, ATIVADOR DE PROTROMBINA E USO DO ATIVADOR DE PROTROMBINA".

A presente invenção refere-se a um processo de purificação de proteínas solúveis das cerdas da *L. obliqua* com atividade ativadora de protrombina; ao processo para determinação parcial da seqüência de aminoácidos do ativador de protrombina; ao Processo de determinação da atividade ativadora de Protrombina da fração II bem como a seqüência N-terminal e seqüência de fragmentos internos da fração ativadora de protrombina ao ativador de protrombina e ao uso do ativador de protrombina partindo-se da homogeneização das cerdas de *L. obliqua*.

A presente invenção vem comprovar que um único componente do veneno da *Lonomia obliqua*, Lopap, causa a síndrome hemorrágica diretamente pela ativação de protrombina e, portanto, deveria encaminhar uma terapia no caso de acidentes com *Lonomia obliqua*.

De acordo com a presente invenção o Lopap é um novo ativador de protrombina, o que é um

importante fator responsável pela coagulopatia de consumo, encontrado em pacientes envenenados por *L. obliqua*.

Em doses baixas a proteína purificada, pela sua capacidade de ativar protrombina gerando trombina, retira da circulação de forma controlada o fibrinogênio, transformando-o em microcoágulos de fibrina. Esta diminuição da concentração plasmática de fibrinogênio permite que o tempo de coagulação do sangue se prolongue e, portanto, impede a trombose vascular aguda.

Pelo fato de não possuir atividade proteolítica a proteína manteria a capacidade coagulante do fibrinogênio não consumido no processo. Desta forma a concentração plasmática de fibrinogênio seria diminuída, porém, não haveria predisposição para um estado hemorrágico. Além disso, poderia ser utilizada na confecção de KITS diagnósticos para detecção de desprotrombinemias.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.